

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EGFR EN GLIOBLASTOMAS: NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

Cristina Zahonero Casans

Licenciada en Biotecnología

Codirectores: Dra. Pilar Sánchez Gómez y Dr. Juan Manuel Sepúlveda Sánchez

Tutor: Dr. Borja Belandía Gómez

Unidad de Neurooncología

UFIEC-ISCIII

Majadahonda (Madrid)



Memoria presentada por **CRISTINA ZAHONERO CASANS** para optar al grado de DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID en el PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA (BIOCIENCIAS MOLECULARES)

Pilar Sánchez Gómez, Doctora en C.C. Químicas y científica titular del Instituto de Salud Carlos III,

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada: **MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EGFR EN GLIOBLASTOMAS: NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS** de la que es autora Cristina Zahonero Casans, Licenciada en Biotecnología, y que ha sido realizada bajo mi dirección y la del Dr. Juan Manuel Sepúlveda Sánchez (Hospital Universitario 12 de Octubre). Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Majadahonda, el día 23 de octubre de 2014.

Pilar Sánchez Gómez
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda (Madrid)

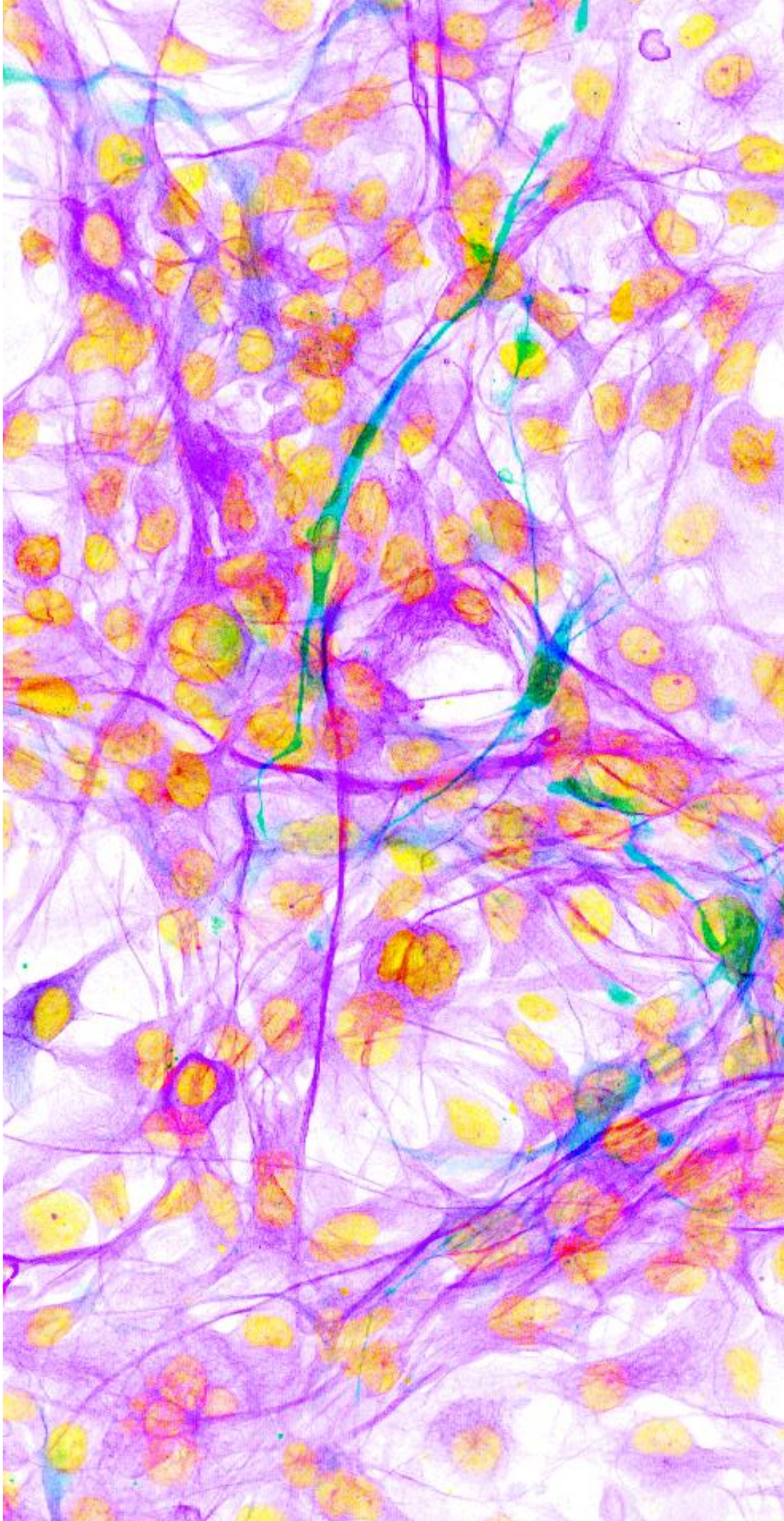
Memoria presentada por **CRISTINA ZAHONERO CASANS** para optar al grado de DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID en el PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA (BIOCIENCIAS MOLECULARES)

Juan Manuel Sepúlveda Sánchez , Doctor en Medicina y Coordinador de la Unidad de Neurooncología del Hospital 12 de Octubre

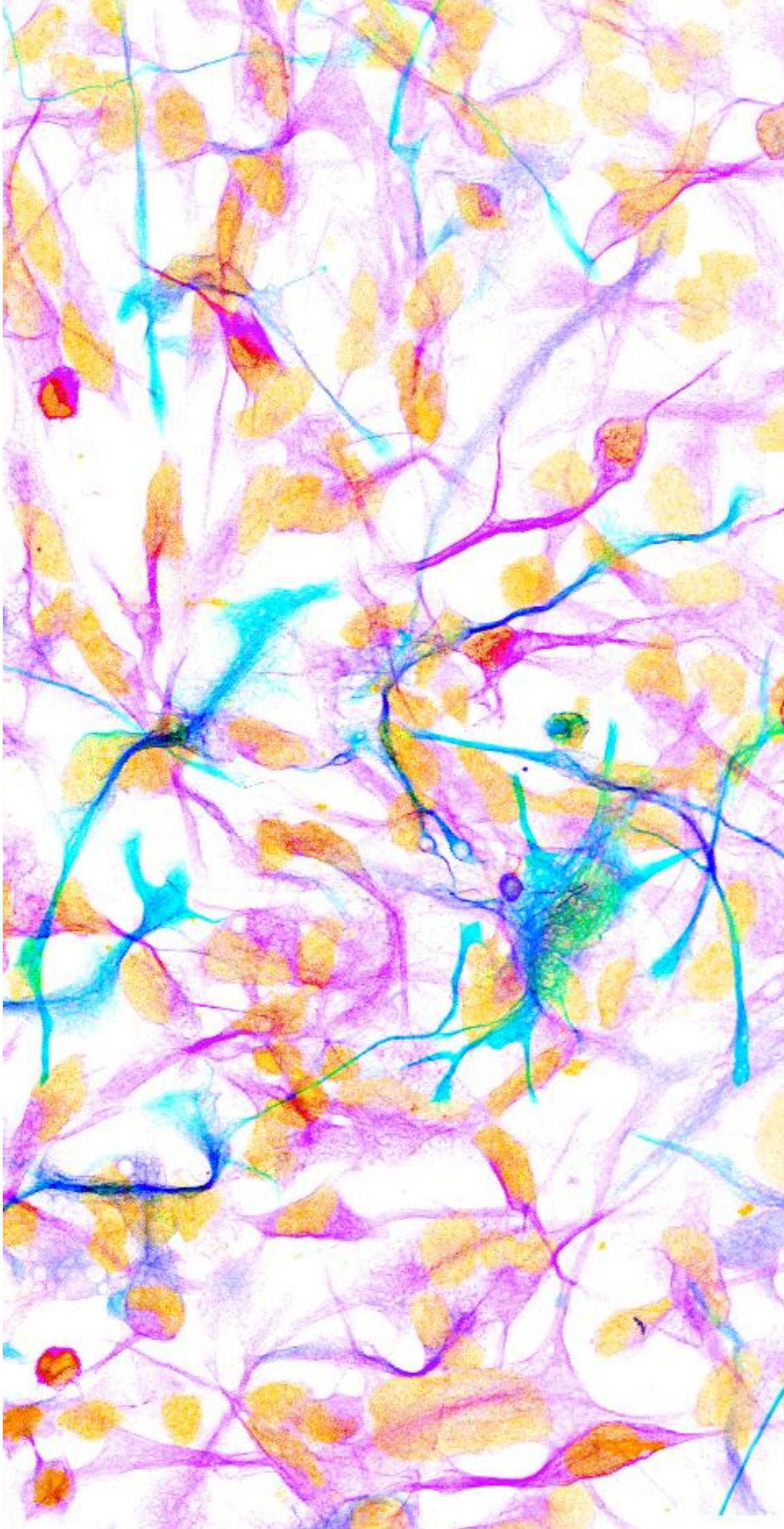
AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada: **MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EGFR EN GLIOBLASTOMAS: NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS** de la que es autora Cristina Zahonero Casans, Licenciada en Biotecnología, y que ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Pilar Sánchez Gómez (Instituto de Salud Carlos III).

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, el día 23 de octubre de 2014.

Juan Manuel Sepúlveda Sánchez
Hospital Universitario 12 de Octubre
Madrid



Als meus pares



“Pienso que si perdemos la curiosidad no hay nada; no hay reflexión y, por tanto, no hay conocimiento y no hay ninguna posibilidad de saber, de llegar al final de algo. Sin curiosidad, directamente no estás vivo”

Luis Eduardo Aute

“Pero un último esfuerzo, uno más, tal vez sea el último, hay que proceder cada vez como si fuera la última, es el único medio de no retroceder”

Samuel Beckett

"Tras un año de investigación, uno cae en la cuenta de que podía haberse hecho en una semana"

William Bragg

Agradecimientos

Es el momento de agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado en el transcurso de los últimos 5 años y que, de algún modo, han sido partícipes de la realización de esta tesis. ¡Gracias a todo/as de antemano!.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis codirectores de tesis. Pilar, gracias por ofrecerme la oportunidad desarrollar este proyecto, por la confianza que has depositado en mí, por tu paciencia y por tu contagiosa curiosidad científica. Gracias también por todo lo que he aprendido, tanto en el laboratorio como en los numerosos cursos, seminarios y congresos a los que he tenido la suerte de asistir durante este periodo de formación. Juan, gracias por tu accesibilidad e implicación, por estar siempre dispuesto a colaborar en nuestros proyectos. Gracias por el esfuerzo que has realizado los dos juntos para que haya podido llegar al final de este recorrido.

Gracias a todas aquellas personas del Hospital 12 de Octubre con las que hemos colaborado a lo largo de estos años. Gracias por su profesionalidad, accesibilidad e implicación, por hacer posible una interacción y comunicación fluida entre la práctica clínica y la investigación básica. Gracias especialmente al Dr. Ricoy, a Aurelio y a Yolanda por su amabilidad y predisposición a ayudarnos. Gracias a todas aquellas personas que han pasado durante estos años por la Unidad de Neurooncología del ISCIII (inicialmente Lab. 111 o PSG), porque de todas ellas he podido aprender algo. Nati, gracias por dejarme ser tu joven Padawan, por enseñarme tantísimas técnicas, por tantas horas compartidas en la cabina de cultivos y operando en el SPF (acompañadas de largas conversaciones, reflexiones y confesiones). Porque has sido una compañera excelente, por nuestra productiva “Titina&Nati Corporation” y nuestro fallido “Minchiclub”. Gracias por escucharme y hacerme reír, por tu paciencia infinita y por ser luz en los momentos más oscuros. Paloma, gracias por tu cariño, por los inmensos abrazos reconfortantes, por preocuparte por mí, por estar siempre dispuesta a ayudarme y por cada vez que aparecías a hacer “El Experimento” y “la Inmuno”. Cris, gracias por llegar al laboratorio cuando ya me había acostumbrado a estar sola, por ser un soplo de aire fresco, por tu paciencia, por brindarme tu amistad y por ser tan buena conmigo. Gracias también a José Manuel, Teresa, Yolanda, Jacqueline, Susana, Almudena, Aurora, Berta y Carmen. Gracias a Marta y Pilar que me han “sufrido” más directamente. Gracias a Helena por su cariño y profesionalidad. Gracias a los integrantes del Lab. 112 por ayudarme y preocuparse por mí, por dejarme ser partícipe de vuestras celebraciones y preocupaciones, habéis sido un auténtico “laboratorio de adopción” para mí. Gracias a Mireia y a Zoraida, las veteranas de laboratorio, por los buenos momentos que hemos pasado juntas. A Rafa, por estar siempre dispuesto a ayudarme y buscar soluciones a todo.

A Pilar, por sus sabios consejos, por escucharme y por su cariño. A Edurne y Ania, por su vitalidad y alegría. A Santi, por sus datos aleatorios y comentarios impredecibles... Y muy especialmente a María, por su incondicional apoyo, su ayuda y su cariño, por acogerme desde el primer momento y por su amistad en este recorrido “tesinero” que hemos andado prácticamente en paralelo. Gracias a Marçal, por interesarse por mí, por su espontaneidad y por las sesiones del “club del cine” que tanto nos han amenizado. Gracias a la gente de su laboratorio por todos los momentos que hemos compartido. Gracias también a nuestros compañeros de laboratorio, al grupo de Yolanda inicialmente y al de Antonio en la “aventura modular”. Gracias a Fernando, por su ayuda y profesionalidad, por dejarme ser “usuaria premium” del confocal y por las conversaciones a ritmo de Bunbury. Gracias también a Silvia por su amabilidad y predisposición. A Raquel de la Unidad de Histología por su ayuda y por ser tan eficiente. A todas aquellas personas del ISCIII que de algún modo han contribuido a la realización de esta tesis.

Gracias a Rebe, por ser una vecina de laboratorio extraordinaria y una gran amiga, por las reflexiones infinitas, los festivales y los recientes “skypes” London-Madrid, gracias por estar siempre disponible, por tu sinceridad y por ser tan auténtica. Gracias a Vane, por haberse convertido en una gran amiga, por su apoyo y sinceridad, por nuestra complicidad y retroalimentación positiva, porque podremos decir que hemos sobrevivido a 2014 y porque juntas “perder la voz cantando una canción es la mejor medicación”.

Gracias a Marina, por la profunda amistad que nos une desde hace tantos años, por esos encuentros en Madrid, Valencia o Berlín. Gracias a Salva, por su incondicional apoyo (y asistencia informática), por comprenderme y aconsejarme. A Davinia, por preocuparse por mí, por los ánimos y por los reencuentros Barcelona-Madrid tan necesarios y reconfortantes durante este periodo. A Giuliana, por su optimismo y su sonrisa permanente, por su incondicional amistad, por cuidarme tanto. Gracias a mis compañeras de piso Patri, Ana y Mariló (o “Convento Saint Mary”), mi pequeña familia madrileña, por todos los momentos que hemos vivido juntas, las risas, los lloros y los vinos terapéuticos en el salón de casa. Gracias por vuestra sinceridad, compañía y por descubrirme tantos lugares y personas increíbles.

Gracia a mi familia por su apoyo en la distancia, por interesarse por mí y transmitirme su cariño. Gracias especialmente a mi prima Mariapi, por haber estado siempre a mi lado, por escucharme, por encontrar siempre tiempo para mí y transmitirme su fuerza a lo largo de este recorrido. Y, por último, gracias a mis padres por su incondicional apoyo, por estar siempre dispuestos a ayudarme en todo. Gracias por enseñarme lo que es realmente importante. Gracias por haberme dejado elegir siempre mi camino, tomar mis propias decisiones. Gracias por quererme tanto y ser tan generosos conmigo.

Resumen

Los **glioblastomas** (GBMs) son tumores cerebrales primarios muy agresivos y resistentes al tratamiento convencional con quimio y radioterapia. Dado que **EGFR** (del inglés *Epidermal growth factor receptor*) se encuentra alterado en el 50 % de los GBMs, representa actualmente una de las dianas terapéuticas más prometedoras en este tipo de tumores. Sin embargo, los inhibidores de la actividad quinasa de EGFR han generado escasos resultados en ensayos clínicos con pacientes de GBM, sin que exista una clara explicación para esta resistencia a dicha terapia. En este trabajo se ha evaluado la eficacia antitumoral de un inhibidor de EGFR de segunda generación denominado dacomitinib (PF299804, Pfizer), que se une de manera irreversible al receptor. Los resultados obtenidos confirman que dacomitinib es capaz de reducir la viabilidad celular, la autorenovación y la proliferación de las células de GBM con *EGFR* amplificado, con independencia de la expresión de la forma mutante EGFRvIII. Además, se ha observado una disminución notable de la tasa de crecimiento tumoral *in vivo* de dichas líneas de GBM tras la administración sistémica de dacomitinib a los ratones, coincidiendo con la reducción de los niveles de expresión de marcadores celulares característicos de célula madre. Sin embargo, nuestros resultados indican también que el efecto del inhibidor es reversible y que los tumores vuelven a crecer cuando se retira el tratamiento. Además, aunque en presencia de dacomitinib se produce una clara inhibición de la cascada de señalización inducida por EGFR, también se observa la acumulación del mismo, lo que podría provocar la activación de otras señales independientes de su actividad quinasa. Es por ello que el presente trabajo explora una estrategia novedosa y alternativa a dacomitinib. Nuestros resultados describen el papel fundamental de **DYRK1A** (del inglés *Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*) en la regulación de la estabilidad de EGFR en las células de GBM. Así hemos comprobado que la inhibición de DYRK1A (ya sea farmacológicamente o genéticamente) es capaz de promover la degradación de EGFR en cultivos primarios de GBM, con una reducción notable de la capacidad de autorenovación de las células tumorales. Además, los resultados obtenidos sugieren que la supervivencia celular de un subgrupo de GBMs depende de la presencia de elevados niveles de EGFR en la superficie celular, ya que la inhibición de DYRK1A provoca un importante descenso de la carga tumoral.

A la luz de los resultados obtenidos, se podría postular que la inhibición de EGFR con dacomitinib y el bloqueo de DYRK1A representan una aproximación terapéutica prometedora en aquellos GBMs dependientes de EGFR, ya sea de manera individual o combinada, bloqueando toda la señalización activada por el receptor, tanto dependiente como independiente de su actividad quinasa.

Summary

Glioblastomas (GBMs) are very aggressive primary brain tumors, which are resistant to conventional chemo and radiotherapy. Since **EGFR** (epidermal growth factor receptor) is altered in almost 50% of GBM, it currently represents one of the most promising therapeutic targets. However EGFR kinase activity inhibitors have produced poor results in clinical trials with GBM patients, with no clear explanation for the therapy resistance observed. Here it has been tested the antitumoral efficacy of a second-generation inhibitor: dacomitinib (PF299804, Pfizer) that binds in an irreversible way to the receptor. The results obtained confirm that dacomitinib is able to reduce the cell viability, the self-renewal and the proliferation of *EGFR* amplified GBM cells, independently of the EGFRvIII mutant form expression. Moreover we have observed a considerable decrease of the *in vivo* tumor growth rate of these *EGFR* amplified cell lines after systemic administration of dacomitinib to the mice, which provokes also a decrease in the expression of stem-cell-related markers. Nevertheless our results point out that the inhibitor effect is reversible and the tumors grow again when the treatment is interrupted. Moreover despite the clear inhibition of EGFR phosphorylation in the presence of the drug we observe also a clear accumulation of the receptor, which could provoke the activation of other signals that are independent of its kinase activity. For that reason we decided to analyze an alternative strategy to dacomitinib. Our results describe the basic role of **DYRK1A** (dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase) in regulating the EGFR stability in GBM cells. We have observed that the inhibition of DYRK1A (pharmacologically or genetically) is able to promote the EGFR degradation in the GBM primary cell cultures, reducing the self-renewal capacity of tumorigenic cells. Moreover, the obtained results suggest that the cell survival of a subset of GBMs depends on the presence of high levels of EGFR on the cell surface, as the DYRK1A inhibition causes a profound decrease in tumor burden.

In light of the obtained results it could be postulated that the inhibition of EGFR with dacomitinib and the blockade of DYRK1A (individually or combined) represent a promising therapeutic approach in those EGFR-dependent GBMs, blocking all the signals activated by the receptor, both dependent and independent of its kinase activity.

Índice de contenidos

Clave de abreviaturas	23
Introducción	27
1 El glioblastoma (GBM)	29
1.1 Los tumores gliales: clasificación e incidencia	29
1.2 Características histológicas del glioblastoma	29
1.3 Presentación clínica y diagnóstico del GBM	30
1.4 Biología molecular del GBM	30
1.5 Tratamiento de los pacientes con GBM	31
1.6 Células iniciadoras de tumores.....	32
2 El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR).....	33
2.1 Características moleculares de EGFR.....	33
2.2 Expresión de <i>EGFR</i> en GBM	34
2.3 Mutaciones de <i>EGFR</i> en GBM.....	35
2.4 Señalización dependiente de la actividad quinasa de EGFR.....	36
2.5 Señalización independiente de la actividad quinasa de EGFR.....	39
2.6 Aproximaciones terapéuticas dirigidas contra EGFR	40
3 DYRK1A	42
3.1 El gen <i>DYRK1A</i>	42
3.2 La proteína DYRK1A: estructura, expresión, función y regulación	42
3.3 Inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A.....	44
4 La relación entre DYRK1A y EGFR	46
5 Expresión de DYRK1A en GBM	47
Objetivos.....	49
Materiales y métodos.....	53
1 Cultivos celulares.....	62
1.1 Establecimiento y mantenimiento de los cultivos primarios de TICs de GBM	62
1.1.1 Recogida de muestras tumorales	62
1.1.2 Establecimiento de cultivos primarios a partir de las muestras tumorales.....	62
1.1.3 Mantenimiento y expansión de los cultivos primarios	63
1.1.4 Criopreservación y descongelación de los cultivos.....	63
1.2 Transducción de cultivos celulares con lentivirus	63
1.2.1 Vectores retrovirales y lentivirales	63
1.2.2 Mantenimiento y expansión de los cultivos de células empaquetadoras 293T	65

1.2.3	Transfección de células 293T para la producción de retrovirus y lentivirus anfitrópicos.....	65
1.2.4	Transducción de los cultivos primarios de GBM con retrovirus y lentivirus	66
1.2.5	Transducción de los cultivos primarios de GBM con retrovirus y lentivirus	66
2	Análisis de expresión	67
2.1	Análisis de expresión génica por medición de ARN mensajero (ARNm)	67
2.1.1	Extracción del ARN total	67
2.1.2	Obtención de ADN complementario (ADNc) y qRT-PCR	67
2.2	Análisis de dosis génica	68
2.2.1	Extracción de ADN genómico (ADNg) y qPCR	68
2.3	Análisis de la expresión proteica por western blot (WB)	68
2.3.1	Preparación de muestras para la extracción proteica	68
2.3.2	Extracción y cuantificación de proteína	68
2.3.3	Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia proteica a membrana de nitrocelulosa	69
2.3.4	Inmunodetección proteica y revelado	70
2.3.5	Desprendimiento de los anticuerpos primarios de las membranas	70
2.3.6	Cuantificación de bandas por densitometría	71
3	Ensayos <i>in vitro</i>	71
3.1	Reactivos	71
3.1.1	Clorhidrato de harmina (o harmina)	71
3.1.2	INDY	71
3.1.3	Dacomitinib.....	72
3.2	Evaluación de los efectos de las drogas antitumorales	72
3.2.1	Determinación de la viabilidad celular (Figura M3A).....	72
3.2.2	Determinación de la capacidad de auto-renovación (Figura M3B).	73
3.2.3	Determinación de la capacidad de proliferación (Figura M3C)	73
3.2.4	Técnicas inmunofluorescentes	74
3.3	Determinación de los niveles de EGFR, de su internalización y degradación.....	75
3.3.1	Medida de los niveles basales de EGFR en membrana por citometría de flujo (Figura M4A)	75
3.3.2	Medida de los niveles de EGFR en membrana y de su internalización tras la estimulación con el ligando (Figura M4B)	76
3.3.3	Medida de la degradación lisosomal de EGFR tras la estimulación con el ligando (Figura M4C)	76

4	Ensayos <i>in vivo</i>.....	78
4.1	Trasplantes de células tumorales a ratones inmunodeprimidos.....	78
4.1.1	Anestesia, analgesia y reversión de la anestesia	78
4.1.2	Trasplantes subcutáneos (Figura M5A)	78
4.1.3	Trasplantes intracraneales (Figura M5B)	79
4.2	Tratamientos farmacológicos	80
4.2.1	Tratamiento con dacomitinib	80
4.2.2	Tratamiento con harmina	80
4.2.3	Tratamiento con doxiciclina.....	81
4.3	Obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN)	81
4.3.1	Administración de contraste y anestesia	81
4.3.1	Adquisición de imágenes de RMN	81
4.4	Procesamiento histológico del tejido	82
4.4.1	Preparación de las muestras para su procesamiento histológico.....	82
4.4.1.1.	Tejido procedente de xenoinjertos intracraneales	82
4.4.1.2.	Tejido procedente de xenoinjertos subcutáneos.....	82
4.4.1.3.	Procesado del tejido con criostato.....	82
4.4.1.4.	Procesado del tejido con microtomo	82
4.4.2	Tinciones inmunofluorescentes.....	83
4.4.3	Microscopía de fluorescencia y confocal	83
5	Análisis estadístico	84
	Resultados.....	85
1	Caracterización de las líneas celulares de TICs de GBM	87
2	Efecto del inhibidor de EGFR dacomitinib en el comportamiento de las TICs de GBM.....	88
2.1	Dacomitinib disminuye la viabilidad de las TICs de GBMs <i>in vitro</i>	88
2.2	Dacomitinib disminuye la capacidad de autorrenovación y de proliferación de las TICs de GBM con amplificación de <i>EGFR in vitro</i>	88
2.3	Dacomitinib disminuye la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM con amplificación de <i>EGFR in vivo</i>	90
2.4	El efecto de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> se revierte al interrumpir el tratamiento.....	92
2.5	El tratamiento con dacomitinib bloquea la señalización a través de EGFR en los tumores subcutáneos.....	93
2.6	El tratamiento con dacomitinib reduce la capacidad de formación de tumores intracraneales de las TICs de GBM con amplificación de <i>EGFR</i>	96

2.7	La ausencia de PTEN funcional limita el efecto de dacomitinib en una línea de TICs de GBM con amplificación de <i>EGFR</i>	98
2.8	Dacomitinib reduce la agresividad y la expresión de marcadores de célula madre en los tumores con amplificación de <i>EGFR</i>	100
3	Efecto de la inhibición de DYRK1A en el comportamiento de las TICs de GBM	104
3.1	Las líneas celulares de TICs de GBM expresan distintos niveles de <i>DYRK1A</i>	104
3.2	La interferencia de <i>DYRK1A</i> en TICs de GBM suprime su capacidad de autorrenovación <i>in vitro</i>	104
3.3	La interferencia de <i>DYRK1A</i> disminuye la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	106
3.4	La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A bloquea la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM <i>in vitro</i>	109
3.5	El efecto de harmina sobre la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM depende de la expresión de EGFR	109
3.6	La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A reduce la capacidad de formación de tumores de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	111
3.7	DYRK1A regula el reciclaje de EGFR en las TICs de GBM	112
3.8	La sobreexpresión de SPRY2 revierte el efecto de la inhibición de DYRK1A sobre la estabilidad de EGFR y la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM.....	116
	Discusión	119
1	Relación entre la inhibición de EGFR y el estado de diferenciación de las células de GBM	122
2	Efecto de dacomitinib en presencia de la isoforma EGFRvIII y/o de mutaciones en <i>PTEN</i> .	124
3	Bloqueo de la señalización mediada por EGFR en respuesta a dacomitinib <i>in vivo</i>	125
4	La inhibición de la estabilidad de EGFR tiene un efecto antitumoral en GBMs.....	127
5	La inhibición de DYRK1A provoca una mayor degradación de EGFR y un menor crecimiento tumoral	130
6	La inhibición de DYRK1A podría estar modulando otras vías de señalización independientes de EGFR	131
7	El papel de DYRK1A en cáncer.....	133
8	Comparativa entre la inhibición directa de EGFR o a través de la inhibición de DYRK1A, posibles sinergias.....	134
	Conclusiones	137
	Bibliografía	141
	Anexos.....	171

Índice de figuras

Figura I1. Motivos estructurales y dominios reguladores de EGFR y de la forma mutante EGFRvIII..	36
Figura I2. Vías de señalización de EGFR dependientes de la actividad quinasas del receptor.....	38
Figura I3. Vías de señalización de EGFR independientes de la actividad quinasas.. ..	39
Figura I4. Relación entre DYRK1A y EGFR.. ..	47
Figura M1. Mapas de los vectores virales.. ..	64
Figura M2. Estructura química de los inhibidores farmacológicos empleados en los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	72
Figura M3. Ensayos <i>in vitro</i>	73
Figura M4. Esquema de los métodos utilizados para el análisis de la estabilidad de EGFR.. ..	77
Figura M5. Esquema de los métodos empleados en los ensayos <i>in vivo</i>	79
Figura R1. Cultivos celulares primarios de TICs de GBM.	87
Figura R2. Dacomitinib disminuye la viabilidad de las TICs de GBM dependientes de EGFR	88
Figura R3. Dacomitinib disminuye la autorenovación y la proliferación las TICs de GBM dependientes de EGFR <i>in vitro</i>	89
Figura R4. Dacomitinib inhibe el crecimiento tumoral de las TICs de GBM con EGFR amplificado <i>in vivo</i>	90
Figura R5. Los tumores subcutáneos generados por las TICs de GBM tratados con dacomitinib son de menor tamaño que los controles en aquellas líneas dependientes de EGFR.	91
Figura R6. El tratamiento con dacomitinib sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> se revierte al interrumpir el tratamiento	92
Figura R7. El efecto de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> es reversible y desaparece al interrumpir el tratamiento	93
Figura R8. Dacomitinib reduce la activación de EGFR en los tumores subcutáneos generados por TICs de GBM.....	94
Figura R9. A largo plazo dacomitinib disminuye ligeramente la señalización a través de algunas de las moléculas diana de EGFR.....	95
Figura R10. El tratamiento con dacomitinib durante 5 días bloquea la señalización a través de EGFR en los tumores subcutáneos generados por líneas de GBM con amplificación de EGFR.. ..	96
Figura R11. El tratamiento con dacomitinib reduce el crecimiento tumoral e incrementa la supervivencia en modelos de crecimiento intracraneal.. ..	97
Figura R12. El tratamiento con dacomitinib reduce la activación de EGFR y de sus principales dianas moleculares en los tumores intracraneales generados por TICs de GBM.....	98

Figura R13. El tratamiento con dacomitinib no produce un efecto significativo en el crecimiento tumoral de una línea celular de GBM con <i>PTEN</i> delecionado.	99
Figura R14. El tratamiento con dacomitinib inhibe la fosforilación de EGFR pero no la señalización a través de sus principales moléculas efectoras en una línea celular de GBM con <i>PTEN</i> delecionado.	100
Figura R15. Dacomitinib reduce la agresividad y la indiferenciación de los tumores generados por TICs de GBM <i>in vivo</i>	101
Figura R16. El tratamiento corto con dacomitinib reduce la expresión de marcadores de células madre en los tumores generados por TICs de GBM <i>in vivo</i>	102
Figura R17. Dacomitinib produce una reducción notable de los marcadores de diferenciación en los tumores generados por TICs de GBM <i>in vivo</i>	103
Figura R18. Caracterización de la expresión de DYRK1A en las líneas de TICs de GBM	104
Figura R19. La interferencia condicional de DYRK1A disminuye los niveles proteicos de EGFR sin afectar a los niveles de ARNm del receptor	105
Figura R20. La interferencia condicional de <i>DYRK1A</i> reduce la capacidad de autorenovación de las TICs de GBM dependientes de EGFR.....	106
Figura R21. La interferencia condicional de <i>DYRK1A</i> incrementa la supervivencia de los ratones con trasplante intracraneal de TICs de GBM	106
Figura R22. La interferencia condicional de <i>DYRK1A</i> afecta a la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	107
Figura R23. La interferencia condicional de <i>DYRK1A</i> reduce los niveles de EGFR de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	108
Figura R24. La interferencia condicional de <i>DYRK1A</i> reduce la proliferación e incrementa la apoptosis de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	108
Figura R25. La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A afecta a la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM	109
Figura R26. El efecto de la inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A sobre la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM depende de los niveles de EGFR	110
Figura R27. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A disminuye la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	111
Figura R28. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A disminuye la proliferación e incrementa la apoptosis de las TICs de GBM <i>in vivo</i>	112
Figura R29. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A reduce los niveles de EGFR en las TICs de GBM <i>in vivo</i>	112

Figura R30. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A estimula la degradación de EGFR en las TICs de GBM.	113
Figura R31. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A incrementa la degradación de EGFR y finaliza la señalización a través del receptor en las TICs de GBM.....	114
Figura R32. La inhibición de DYRK1A estimula la degradación lisosomal de EGFR en las TICs de GBM..	115
Figura R33. La sobreexpresión de SPRY2 revierte el efecto de la harmina sobre la degradación de EGFR en las TICs de GBM.	116
Figura R34. La sobreexpresión de SPRY2 revierte el efecto de la harmina sobre la capacidad de autorrenovación en las TICs de GBM.....	117
Figura D1. Regulación del recambio de EGFR.....	129

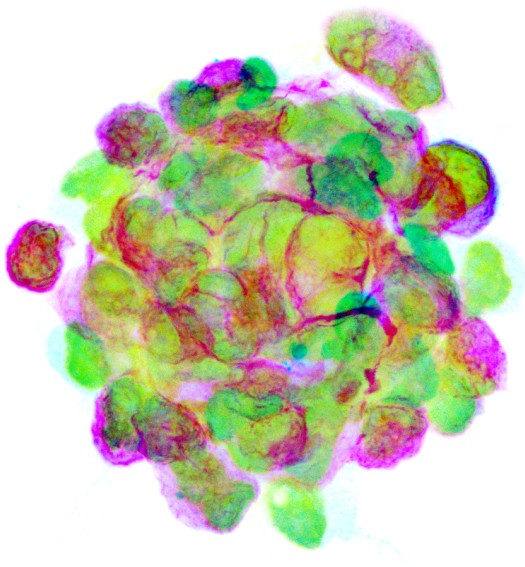
Índice de tablas

Tabla I1. Inhibidores de la actividad quinasa de DYRK1A.....	45
Tabla M1. Reactivos utilizados en las técnicas descritas en este apartado.....	55
Tabla M2. Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT-PCR con ADNc.	58
Tabla M3. Condiciones empleadas en las qRT-PCRs sobre ADNc y las qPCRs sobre ADNg.	58
Tabla M4. Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qPCR con ADNg.....	59
Tabla M5. Condiciones empleadas en la qRT-PCR para la detección de la forma <i>EGFRvIII</i>	59
Tabla M6. Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunodetección.....	60
Tabla M7. Anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunodetección.....	61
Tabla R1. Caracterización molecular de las líneas celulares de TICs de GBM	87

ADN: ácido desoxirribonucleico	DYRK1A: Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
ADNc: ácido desoxirribonucleico copia	EBRT: external beam radiotherapy
ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico	EC: región extracelular
AP-4: activating enhancer binding protein 4	EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
APS: ammonium persulfate	EGCG: epigallocatechin gallate
ARN: ácido ribonucleico	EGF: Epidermal growth factor
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	EGFR: Epidermal growth factor receptor
ARNsh: ácido ribonucleico “short hairpin”	eIF4E: Eukaryotic initiation factor 4E
AKT o PKB: Protein kinase B	EMP3: Epithelial membrane protein 3
ALDH: Aldehyde dehydrogenases	EOR: extension of resection
ATP: Adenosine triphosphate	ERK: Extracellular-signal-regulated kinase
Cbl: Casitas B-lineage lymphoma	EVH1: Enabled/VASP homology 1 domain
BAD: Bcl-2-associated death promoter	FBS: fetal bovine serum
BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina	FDA: Food and Drug Administration
BSA: bovine serum albumin	bFGF: basic Fibroblast growth factor
CDK: Cycline dependent kinase	FGFR: Fibroblast growth factor receptor
CDKN2A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	FITC: fluorescein isothiocyanate
CHX: cicloheximida	FOV: field of view
CK2: casein kinase II	GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
CLK: CDC-like kinase	GBM: glioblastoma
CMV: citomegalovirus	GC-GBM: giant cells glioblastoma
CNPase: 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	GFAP: Glial fibrillary acid protein
COX-2: Cyclooxygenase 2	GS: gliosarcoma
CSC: cancer stem cell	GSK: Glycogen synthase kinase
DAG: diacyl-glycerol	GTP: Guanosine-5'-triphosphate
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	Gy: gray
DMAT: 2-dimetilamino-4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -benzimidazol	HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium	HBS: hepes buffered saline
DMSO: dimetil sulfóxido	HDAC: Histone deacetilase
DNA-PK: DNA-dependent protein kinase	HE: hematoxilina-eosina
Dox: doxiciclina	HNSCC: head and neck squamous carcinoma

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	NRSF: Neuron-restrictive silencer factor
IDH: Isocitrate dehydrogenase	NSC: neural stem cell
IKKα: I κ B kinase alpha	NSCLC: non-small cell lung cáncer
iNOS: Inducible nitric oxide synthase	o/n: over night
IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate	OSP: Oligodendrocyte-specific protein
JAK2: Janus kinase 2	PB: phosphate buffer
JNKs: c-Jun N-terminal kinases	PBS: phosphate buffered saline
KLH: Keyhole limpet hemocyanin	PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
L1CAM: L1 cell adhesion molecule	PDGFR: Platelet derived growth factor receptor
LIF: Leukemia inhibitory factor	PET: positron emission tomography
LIGR1: Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1	PFA: paraformaldehído
LOH: loss of heterozigosity	PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
mAb: monoclonal antibodies	PIP₃: Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
MAPK: Mitogen activated protein kinase	PKC: Protein kinase C
MC: medio completo	PLCγ: Phospholipase C, gamma isotype
MC-SUP: medio complete suplementado	PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
MDM2: Mouse double minute 2 homolog	PTB: Phosphotyrosine-binding domain
MDM4: Mouse double minute 4 homolog	PTEN: Phosphatase and tensin homolog
MGMT: Methylguanine methyltransferase	PUMA: P53 upregulated modulator of apoptosis
MIG-6: Mitogen-inducible gene 6	qRT-PCR: quantitative real time poyimerase chain reaction
mTOR: Mammalian target of rapamycin	QT: quimioterapia
MW: molecular weight	RB1: Retinoblastoma 1
NDRG2: N-myc downstream-regulated gene 2	REST: RE1-Silencing Transcription factor
NF1: Neurofibromin 1	RFP: red fluorescent protein
NFATc1: nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1	rpm: revoluciones por minuto
NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	RT: radioterapia
NFκI1A: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	rtTA3: reverse tetracycline transactivator
NLS: nuclear localization signal	RTK: Receptor tyrosine kinase
	S6K: Ribosomal protein S6 kinase
	SDS: sodium dodecyl sulfate

SEM: standard error of the mean	TEMED: tetramethylethylenediamine
SEZ: subependymary zone	TGFα: Transforming growth factor alpha
SGLT1: Sodium-glucose linked transporter 1	TIC: tumor initiating cell
SFK: Src family kinase	TIMP-3: TIMP metalloproteinase inhibitor 3
SH2: Src homology 2	TK: Tyrosine kinase
SHH: Sonic hedgehog	TKI: Tyrosine kinase inhibitor
SNC: sistema nervioso central	TKR: Tyrosine kinase receptor
SPECT: single-photon emission computed tomography	TMZ: temozolomida
SPRY2: Sprouty 2	TP53: Tumor protein p53
STAT: Signal transducer and activator of transcription	TR: tiempo de repetición
TAC: tomografía axial computerizada	TRE: Tetracycline response element
TBB: 4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -benzotriazol	uPAR: Plasminogen activator urokinase receptor
TBI: 4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -benzimidazo	VEGF: Vascular growth factor
TBS: tris-buffered saline	VEGFR: Vascular growth factor receptor
TE: tiempo de eco	WB: western blot
	WHO: World Health Organization



INTRODUCCIÓN

1 El glioblastoma (GBM)

1.1 Los tumores gliales: clasificación e incidencia

Los tumores cerebrales primarios de adulto constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que derivan de distintos linajes celulares. Entre ellos, los gliomas representan el grupo más importante, constituido por tumores de distinto grado según la presencia de cuatro características histopatológicas clave: atipia nuclear, células mitóticas, proliferación microvascular y necrosis, en base al sistema WHO (del inglés *World Health Organisation*) de **clasificación**. Así pues, un tumor se clasifica como grado IV (GBM) si presenta atipia nuclear, células mitóticas y, al menos, uno de estas dos: necrosis o proliferación vascular; si presenta atipia nuclear y células mitóticas, pero no necrosis o proliferación vascular, será clasificado como grado III (astrocitoma maligno/anaplásico) y si tan solo posee atipia nuclear se denominará astrocitoma difuso o grado II. Los tumores de grado I (astrocitomas pilocíticos) están relacionados con los anteriores pero, en general, se consideran lesiones benignas. Además, actualmente se reconocen tres variedades morfológicas de GBM: el GBM clásico, el gliosarcoma (GS) y el GBM de células gigantes (GC-GBM, del inglés *giant cells glioblastoma*) (Clarke et al. 2010; Louis et al. 2007). La tasa de **incidencia** del GBM en Europa es de 5/100.000 adultos por año, siendo ligeramente superior en hombres (la ratio hombres/mujeres es de 1,5) y con una cierta variabilidad en la incidencia de este tipo de tumor entre países y grupos étnicos. La incidencia máxima se observa en la población comprendida entre los 65 y 74 años (Lisak et al. 2009).

1.2 Características histológicas del glioblastoma

A nivel histopatológico los GBMs se caracterizan por la presencia de células infiltrantes, pleomórficas, hipercromáticas y con un citoplasma astrocítico claro, que sugieren una lesión agresiva de origen glioneuronal. El tamaño de las células presentes en el tumor puede ser muy variable: de pequeñas células uniformes a células gigantes de gran tamaño. Son típicas de estos tumores las necrosis en pseudoempalizada (con un área necrótica central rodeada por una región de células tumorales altamente proliferativas) y la proliferación microvascular, con acúmulo de capas endoteliales y con formación de estructuras glomeruloides. El origen glial de los tumores se determina mediante la tinción de la proteína GFAP (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*), mientras que la tinción de Ki-67 (con el anticuerpo MIB-1) evidencia las células proliferativas del tumor. La mayor parte de los GBMs son de carácter primario y aparecen repentinamente, sin evidencias clínicas o histológicas de la existencia de lesiones previas de menor grado, en personas de edad generalmente avanzada. Los GBMs secundarios progresan a partir de gliomas de bajo grado, aparecen en pacientes más jóvenes y se caracterizan por poseer niveles inferiores de necrosis y un mejor pronóstico (Ohgaki and Kleihues 2013).

1.3 Presentación clínica y diagnóstico del GBM

La **sintomatología** de los pacientes con GBM varía en función del tamaño y la localización del tumor, el grado de invasión y la presencia de inflamación en el tejido cerebral adyacente. No obstante, los síntomas más frecuentes son los siguientes: alteraciones de las funciones mentales (cognitivas y sensoriales), dolores de cabeza, convulsiones y debilidad en alguna zona del cuerpo. Además, la mayor parte de los tumores cerebrales aumentan la presión intracraneal debido a su tamaño.

Las **pruebas diagnósticas** que se realizan cuando hay sospecha de la presencia de un tumor cerebral son la exploración física y neurológica del paciente y las pruebas radiológicas convencionales. Tras este primer examen clínico del paciente, se emplean técnicas de imagen más sofisticadas para determinar la extensión del tumor, el número de lesiones, las zonas afectadas y la presencia de complicaciones secundarias (como la hemorragia). Las principales técnicas que permiten realizar un diagnóstico diferencial son la tomografía axial computarizada (TAC), la resonancia magnética (RM), la tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*) y la tomografía por emisión de positrón único (SPECT, del inglés *single-photon emission computed tomography*). Por último, el análisis microscópico del tejido tumoral (obtenido por biopsia estereotáctica o tras la extirpación del mismo) permite confirmar con seguridad el diagnóstico definitivo.

1.4 Biología molecular del GBM

Los GBMs se caracterizan por la presencia de múltiples alteraciones genéticas entre las que destacan las amplificaciones génicas, las pérdidas de heterozigosidad (principalmente del cromosoma 10) y las mutaciones de genes que confluyen en la activación de vías de señalización que implican a TP53 (del inglés *Tumoral protein 53*), PTEN (del inglés *Phosphatase and tensin homolog*) /PI3K (del inglés *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*)/AKT, MAPKs (del inglés *Mitogen activated protein kinases*) y RB1 (del inglés *Retinoblastoma 1*) (Riemenschneider and Reifenberger 2009). Además, la presencia de ciertas aberraciones genéticas permite discernir los GBMs primarios y secundarios, a pesar de compartir características histológicas y una evolución clínica similar. Los **GBMs primarios**, originados *de novo*, presentan con frecuencia la amplificación de *EGFR*, *CDK4* (del inglés *Cyclin dependent kinase 4*), *MDM2* o *MDM4* (del inglés *Mouse double minute homolog*), la delección homocigótica de *CDKN2A* (del inglés *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) y *p14^{ARF}*, la mutación o delección homocigótica de *RB1*, la monosomía del cromosoma 10 y la mutación de *PTEN*. Sin embargo, la mutación de *TP53* está presente en menos del 30 % de los tumores (Fujisawa et al. 2000; Ohgaki and Kleihues 2007).

Por otro lado, en los **GBMs secundarios**, generados a partir de una lesión previa de menor grado, *TP53* e *IDH1-2* (del inglés *Isocitrate dehydrogenase 1-2*) se hallan mutados en dos tercios de los casos. De hecho, ha sido la identificación de la mutación de *IDH1* como marcador molecular de GBM secundario lo que ha permitido discernir los patrones genéticos de las dos entidades tumorales. Además, la presencia de mutaciones en *IDH1* e *IDH2* se considera como un factor de buen pronóstico (Tanaka et al., 2013). En los GBMs secundarios también son frecuentes las pérdidas alélicas en 19q y 13q, la hipermetilación del promotor del gen *RB1*, y la sobreexpresión de *PDGFRA* (del inglés *Platelet derived growth factor receptor alpha*). Sin embargo, es rara la presencia de *EGFR* o *MDM2* amplificados, la mutación de *PTEN* y las deleciones homocigóticas de *CDKN2A* o *p14^{ARF}* (Balss et al. 2008; Nakamura et al. 2000; Nobusawa et al. 2009; Ohgaki et al. 2004; Ohgaki and Kleihues 2007; Watanabe et al. 2009; Yan et al. 2009). Asimismo, se ha detectado que el silenciamiento epigenético de genes como *MGMT* (del inglés *Methylguanine methyltransferase*), *TIMP-3* (del inglés *TIMP metalloproteinase inhibitor 3*), *RB1*, *p14^{ARF}* y *p16^{INK4a}* es más frecuente en los GBMs secundarios que en los primarios (Ohgaki and Kleihues 2007).

1.5 Tratamiento de los pacientes con GBM

El tratamiento estándar actual comienza con la extirpación quirúrgica del tumor, seguida por la administración de radio y quimioterapia con temozolomida (TMZ). Sin embargo, la supervivencia media libre de progresión no supera los 7 meses y la mayoría de los pacientes no alcanzan los 2 años de vida desde el diagnóstico (Clarke et al. 2010; Tanaka et al. 2013). El **tratamiento quirúrgico** tiene como principal objetivo la eliminación de la mayor parte del tejido tumoral para favorecer la efectividad de las terapias adyuvantes y mitigar el efecto de masa que genera sobre el tejido adyacente, pero también permite la realización del diagnóstico histopatológico del tumor. En los últimos años se ha mejorado el grado de resección tumoral (debido a las mejoras en las técnicas de imagen y monitorización intraoperatoria), sin embargo, la extirpación completa a nivel microscópico es prácticamente imposible debido al carácter infiltrativo de estos tumores. La **radioterapia (RT)** que se utiliza en el tratamiento estándar de los pacientes con GBM es la RT externa fraccionada (EBRT, del inglés *external beam radiotherapy*) y consiste en la irradiación de la zona del tumor (RT focal) durante seis semanas, comenzando unas 4 semanas después de la intervención y utilizando una dosis total de 60 Gy en 30 fracciones de 2 Gy. A nivel celular la radiación provoca roturas en las cadenas de ADN y desencadena alteraciones estructurales que conducen a la muerte celular. La **quimioterapia (QT)** se realiza con el agente alquilante TMZ, administrado por vía oral. Se administra una dosis diaria de TMZ de 75 mg/m²/día durante 6 semanas, concomitante con la RT y los 6 meses siguientes se continúa con un tratamiento adyuvante de 150-200 mg/m² de TMZ durante 5 días seguidos de cada 28 días (Stupp

et al. 2005). La TMZ actúa generando aberraciones genéticas en las células tumorales mediante la adición de grupos metilo a las bases de purina del ADN (en las posiciones O6 y N7 de la guanina y la posición N3 de la adenina). La principal lesión citotóxica, O6-metilguanina (O6-MeG), puede ser eliminada por la enzima MGMT, de manera que la respuesta de los pacientes al tratamiento con TMZ es variable y presenta un mejor pronóstico en aquellos con tumores con el promotor del gen *MGMT* metilado y sin expresión la enzima reparadora del ADN (Hegi et al. 2005).

Cuando el tratamiento de primera línea no es efectivo, los pacientes desarrollan un **GBM recurrente** de muy mal pronóstico pues presentan un tiempo medio de progresión al tratamiento de segunda línea de unas 10 semanas y una supervivencia total de unas 30 semanas (Wong et al. 1999). El tratamiento en estos casos es individualizado para cada paciente y se basa en su edad, su estado general, la extensión de la resección inicial del tumor, el tipo de tratamiento inicial y la respuesta al mismo, el tiempo transcurrido desde el diagnóstico y el tipo de recurrencia (local o difusa). Las cirugías repetidas, la re-irradiación y la QT (monoterapia o terapia combinada) en segunda línea están dirigidas principalmente a la reducción de la carga y extensión tumoral (Weller et al. 2013). En el tratamiento de segunda línea se han empleado diversos fármacos (TMZ, nitrosureas, platinoides, inhibidores de topoisomerasas, etc.) y se están evaluando inhibidores de EGFR, VEGFR (del inglés *Vascular growth factor receptor*), PDGFR, mTOR (del inglés *Mammalian target of rapamycin*), PI3K, HDAC (del inglés *histone deacetylase*) y farnesiltransferasa, sin ocasionar grandes mejoras en los pacientes con recidiva de GBM (Mrugala 2013). En este contexto, el uso del agente antiangiogénico bevacizumab (anticuerpo que reconoce a VEGFR) en los últimos años, solo o en combinación con otros agentes citotóxicos, ha generado un gran debate sobre su capacidad de mejorar la supervivencia y/o la calidad de vida de los pacientes (Desjardins and Friedman 2014).

1.6 Células iniciadoras de tumores

Existen dos hipótesis alternativas que tratan de explicar cómo se origina un tumor. En primer lugar, el **modelo estocástico** postula que todas las células del tumor poseen el mismo potencial tumorigénico y que cualquiera de ellas puede actuar como una célula iniciadora de tumores (TIC, del inglés *tumor initiating cell*). Considera que el tumor es una masa de células hiperproliferativas que durante la progresión adquieren mutaciones adicionales y encuentran microambientes capaces de seleccionar las células más aptas para mantener un crecimiento ilimitado del tumor. En segundo lugar, el **modelo jerárquico** sostiene que los tumores malignos son iniciados por un conjunto de células que comparten características biológicas con las células madre, o bien que las adquieren por dediferenciación. Más aún, considera que dichas células persisten dentro de la masa tumoral y son las únicas con capacidad de crecimiento ilimitado. Por

eso, son denominadas células madre cancerosas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*). Las CSCs de GBM presentan características análogas a las células madre neurales (NSCs, del inglés *neural stem cells*) y se identifican por presentar una elevada capacidad de autorenovación, tanto *in vitro* (formación secuencial de clones) como *in vivo* (trasplantes seriados), y por ser capaces de generar tumores con el mismo fenotipo que el tumor parental tras su trasplante ortotópico. A diferencia de las NSCs, las CSCs de GBMs poseen alteraciones genéticas, de cariotipo y de sus propiedades de diferenciación a los distintos linajes celulares (Persano et al. 2013). Además, numerosas evidencias sugieren que la capacidad de diferenciación de una CSC es reversible, por lo que la jerarquía celular en un tumor no sería tan estricta como en un tejido sano. En los últimos años se han propuesto diversos marcadores para la identificación, cuantificación y aislamiento de las CSCs de GBM del resto de la población tumoral, entre los que destacan CD133 (o prominina 1), CD15, CD44, ID1, L1CAM (del inglés *L1 cell adhesion molecule*) y ALDH (del inglés *Aldehyde dehydrogenase*), entre otros. Sin embargo, ninguno de ellos ha proporcionado resultados consistentes y generalizables a todos los GBMs (Brescia et al. 2012). A pesar de la ausencia de buenos marcadores moleculares para la identificación y el aislamiento de las CSCs o TICs de GBM, se han desarrollado protocolos que permiten el enriquecimiento de este tipo de células *in vitro*. Para ello, las células obtenidas a partir de la disgregación de las muestras tumorales de pacientes con GBM son cultivadas en medios con los factores de crecimiento epitelial (EGF, del inglés *Epithelial growth factor*) y fibroblástico (bFGF, del inglés *basic Fibroblastic growth factor*) y en ausencia de suero, que induce la diferenciación de las células, la disminución de la expresión de marcadores de células madre y el incremento de marcadores de células gliales maduras (GFAP, β III-Tubulina y CNPase, del inglés *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*). Estas células crecen formando unos agregados denominados neuroesferas que pueden originar tumores al ser transplantadas en ratones inmunodeficientes, con las características moleculares e histológicas de los tumores de origen (Galli et al. 2004; Lee et al. 2006). Por otro lado, las CSCs o TICs están muy implicadas en la resistencia a QT y RT y se consideran responsables de las recidivas y la progresión tumoral de los GBMs, constituyendo el principal objetivo de las estrategias terapéuticas que se están desarrollando en los últimos años (Beier et al. 2011).

2 El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR)

2.1 Características moleculares de EGFR

El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), también llamado HER-1 o c-erbB-1, constituye junto con HER2/neu (c-erbB-2), HER3 (c-erbB-3) y HER4 (c-erbB-4) la familia de receptores quinasa tipo I. EGFR es el receptor de ligandos extracelulares de la familia EGF entre los que se hallan el propio EGF, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α , del inglés

Transforming growth factor alpha), anfirregulina, betacelulina, epirregulina y el factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF, del inglés *Heparin-binding EGF-like growth factor*) (Yarden 2001). EGFR tiene un peso molecular de 170 kDa y está codificado por un gen de gran tamaño, que consta de 28 exones y se localiza en la región cromosómica 7p11-13. Su producto proteico se genera a partir de un polipéptido precursor de 1.210 aminoácidos, procesado mediante una escisión en la región N-terminal para dar lugar a una proteína de 1.186 aminoácidos que consta de tres regiones principales: la extracelular (EC), la transmembrana (TM) y la intracelular (IC), esta última con actividad tirosina quinasa (TK) (Figura I1). La región EC se puede dividir en cuatro dominios, siendo L1 (aminoácidos 1-165) y L2 (aminoácidos 310-481) los responsables de la unión a ligando (interacciona directamente con el dominio L2) y los dominios ricos en cisteína CR1 (aminoácidos 166-309) y CR2 (aminoácidos 482-621), poseedores de sitios de N-glicosilación, los que forman los puentes disulfuro encargados de definir la conformación terciaria de la región EC del receptor. La dimerización de las moléculas de EGFR se produce tras la interacción con el ligando y resulta en la activación de su función quinasa y en la auto o transfosforilación de residuos tirosina en la región C-terminal de la molécula. El dominio TK de EGFR puede presentar dos conformaciones distintas: en la inactiva el receptor podría inhibir su propia actividad pero, tras la inducción de su dimerización por ligando, el incremento de la concentración local del dominio TK provocaría un cambio alostérico que conduciría a la activación del receptor (Zhang et al. 2006). La interacción entre las moléculas de EGFR se produce a través de un bucle largo que sobresale del dominio CR1 y puede dar lugar a homo o heterodímeros (unión de EGFR a otros miembros de la familia c-erbB), con diferente afinidad por ligando y una variada activación de vías de señalización subyacentes (Zawrocki and Biernat 2005).

2.2 Expresión de *EGFR* en GBM

Se estima que *EGFR* está amplificado en el 30-40 % de los GBMs y sobreexpresado en aproximadamente el 50 % de los tumores (Furnari et al. 2007; Riddick and Fine 2011). Esta amplificación es poco frecuente en pacientes menores de 35 años, siendo la media de edad de los pacientes con dicha alteración de 62 años (Ohgaki and Kleihues 2013). Desde el punto de vista histológico la amplificación de *EGFR* es relativamente común en GBMs clásicos (69 %) pero rara en GS (0 %) y en GC-GBM (6 %) (Hatanpaa et al. 2010). Desde el punto de vista neuropatológico, la identificación de la amplificación de *EGFR* o de otras mutaciones en el receptor son indicios de que el tumor es un GBM o de que debería ser tratado como tal, aunque no se detecten necrosis y proliferación microvascular en la biopsia (Heimberger et al. 2005). La presencia de alteraciones en *EGFR* se ha asociado con peores datos de supervivencia en pacientes jóvenes, mientras que se relaciona con un buen pronóstico en pacientes de avanzada edad (Heimberger et al.

2005;Batchelor et al. 2004;Shinojima et al. 2003;Simmons et al. 2001;Smith et al. 2001) y está presente en el 26 % de los pacientes que sobreviven a largo plazo (más de 3 años) (Krex et al. 2007), sugiriendo que se trata de una vía oncogénica que no es mucho más agresiva que otras alteraciones características de los GBMs.

2.3 Mutaciones de *EGFR* en GBM

Existen varios mecanismos capaces de justificar la activación de la vía de señalización de *EGFR* en GBM. En primer lugar, la sobreexpresión del receptor podría generar por sí misma una acumulación local del dominio quinasa capaz de desencadenar su activación, de forma similar a la sobreexpresión y/ o amplificación génica de sus ligandos (Endres et al. 2011;Schlegel et al. 1990;Yung et al. 1990). En segundo lugar, muchos de los GBMs con *EGFR* amplificado presentan mutaciones adicionales en dicho gen, siendo muy frecuentes las delecciones que originan las variantes *EGFRvI* a *EGFRvV* (Endres et al. 2011;Zawrocki and Biernat 2005), con una actividad alterada y capaces de promover el crecimiento tumoral (Nicholas et al. 2006;Zawrocki and Biernat 2005). Se han identificado también mutaciones puntuales sin sentido en la región extracelular del receptor que favorecen su dimerización y poseen actividad oncogénica (Nicholas et al. 2006). Sin embargo, la presencia de mutaciones en la región intracelular de *EGFR* es más frecuente en otro tipo de neoplasias (Minna et al. 2004) y no se han detectado en GBM (Pines et al. 2010).

En particular, la **forma mutante *EGFRvIII*** representa el 60-70 % de las mutaciones existentes en GBM y se halla en el 30-40 % de los tumores. Se caracteriza por la delección de los exones 2 a 7 del dominio EC y codifica un receptor que carece de los aminoácidos 6 a 273 (Figura I1), con una nueva conformación terciaria del dominio EC (Frederick et al. 2000). Se ha propuesto que el efecto oncogénico de *EGFRvIII* se debe a su actividad quinasa constitutiva, similar a la de *v-erbB* (homólogo viral de *EGFR*), existente principalmente en forma de dímero (Downward et al. 1984b). De hecho, se ha descrito una señalización particular para la forma *EGFRvIII* (Ramnarain et al. 2006), capaz de activar de forma selectiva y/o constitutiva las rutas que implican a PI3K (Narita et al. 2002;Zhu et al. 2009), Ras (Prigent et al. 1996), JNKs (del inglés *c-Jun N-terminal kinases*) (Antonyak et al. 1998), SFKs (del inglés *Src family kinases*) (Lu et al. 2009), uPAR (del inglés *Plasminogen activator urokinase receptor*) (Hu et al. 2011) y NF-κB (del inglés *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Puliyappadamba et al. 2013). La expresión de *EGFRvIII* se considera un factor independiente de mal pronóstico (Shinojima et al. 2003) y que proporciona resistencia a fármacos y radiación ionizante (Lammering et al. 2003;Nagane et al. 1998). Asimismo, la expresión de *EGFRvIII* en pacientes de GBM se produce exclusivamente junto con la amplificación de *EGFR* (Frederick et al. 2000), sugiriendo una comunicación entre el

receptor mutante y el salvaje en las células tumorales que regula la acción oncogénica de ambos receptores (Fan et al. 2013; Li et al. 2013).

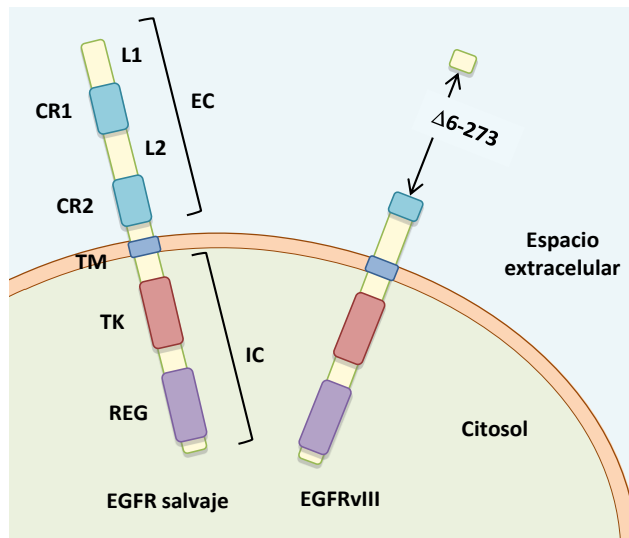


Figura I1. Motivos estructurales y dominios reguladores de EGFR y de la forma mutante EGFRvIII. El receptor salvaje consta de las regiones extracelular (EC), transmembrana (TM) e intracelular (IC). La región EC está formada por cuatro dominios, de los cuales L1 y L2 forman el bolsillo de unión a ligando y el dominio rico en cisteína CR1 contiene el brazo de dimerización. En la región IC se localiza el dominio tirosina quinasa (TK) y la región reguladora (REG), que incluye sitios de autofosforilación y el dominio de internalización. A la derecha el receptor mutante EGFRvIII carece de los aminoácidos 6 a 273 y no puede formar el bolsillo de unión a ligando.

2.4 Señalización dependiente de la actividad quinasa de EGFR

La señalización de EGFR se activa por un mecanismo que consta de tres etapas: la dimerización de los dominios EC inducida por la interacción con un ligando específico; la autofosforilación de cinco residuos tirosina específicos del dominio IC (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173, siendo Y1173 el sitio principal de fosforilación) (Downward et al. 1984a; Hsuan 1993); y el reclutamiento de moléculas que se asocian con las fosfotirosinas de EGFR a través de dominios SH2 (del inglés *Src Homology 2*) o PTB (del inglés *Phosphotyrosine-binding*), que son fosforiladas en su mayoría por el propio receptor. Estas interacciones conectan la activación del dominio TK de EGFR con la señalización a través de una serie de vías de gran importancia biológica que se ilustran en la Figura I2.

EGFR se ha relacionado con la proliferación celular a través de la activación de **la vía de señalización de las MAPKs y las ERKs** (del inglés *Extracellular signal-regulated kinases*) (Pearson et al. 2001). En particular, la expresión de ERK y fosfo-ERK se ha correlacionado con una baja supervivencia en pacientes de GBM (Mawrin et al. 2003). Sin embargo, se han detectado escasas mutaciones en moléculas de esta vía de señalización, entre las que destacan las que activan a Ras y sobre todo las que inactivan la función de NF1 (Riddick and Fine 2011).

EGFR modula el balance entre senescencia y apoptosis a través de la **vía de señalización de PI3K**, con la generación del segundo mensajero PIP3 (del inglés *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) y la activación de AKT, cuya señalización inhibe de la muerte celular programada y favorece la expresión de genes implicados en la supervivencia celular (Koul 2008; Bai et al. 2009). Además, AKT activada (o fosforilada, AKT-P) promueve el crecimiento celular mediante la

activación de mTOR y de sus efectores eIF4E (del inglés *Eukaryotic initiation factor 4E*) y S6K1/2 (del inglés *ribosomal protein S6 kinase*) (Inoki et al. 2002; Gingras et al. 2001). En GBM es frecuente la presencia de alteraciones (mutaciones activadoras y amplificaciones) en moléculas de la vía de PI3K (Anon 2008; Gallia et al. 2006; Kita et al. 2007; Mizoguchi et al. 2004; Anon 2008; Sun et al. 2010), asociadas a una evolución clínica desfavorable. Por otro lado, AKT es desfosforilada por la proteína supresora tumoral PTEN, codificada por un gen que se halla deletado, mutado o genéticamente silenciado en el 40-50 % de los gliomas (Anon 2008; Karpel-Massler et al. 2009; Koul 2008).

La activación de **la vía de señalización de STAT3** (del inglés *Signal transducer and activator of transcription 3*) a través de EGFR o de otras moléculas provoca su dimerización y translocación al núcleo donde actúa modificando la expresión de determinados genes (Levy and Darnell, Jr. 2002). Se ha descrito que STAT3 se halla constitutivamente activo en astrocitomas de alto grado (Kim et al. 2013) y se ha asociado con la progresión del ciclo celular, la muerte celular por apoptosis y la inmunosupresión en GBM (Brantley and Benveniste 2008; See et al. 2012). Asimismo, se ha descrito la coexistencia de la activación constitutiva de STAT3 con la sobreexpresión de EGFR en aproximadamente el 30 % de los gliomas de alto grado (Lo et al. 2008).

La **señalización a través de PLCγ** (del inglés *Phospholipase C-gamma*) **y de PKC** (del inglés *Protein kinase C*) inducida por EGFR se asocia a la regulación de la proliferación, la apoptosis, la supervivencia y la migración celular (Mackay and Twelves 2007). Además, conduce a la translocación nuclear de NFκB, la supresión de señales pro-apoptóticas (Yang et al. 2013), y la sobreexpresión de PKM2 (del inglés *Pyruvate kinase M2*), implicada en la regulación de la glicólisis y de la respuesta a hipoxia (Luo and Semenza 2011; Yang et al. 2013), contribuyendo a la supervivencia de las células de GBM en un nicho tumorigénico hostil. Así pues, la expresión de PKC o de PLCγ se correlaciona con una baja supervivencia en pacientes de GBM (Mawrin et al. 2003), de igual manera que la frecuente delección génica de *NFκ1A* (del inglés *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), que codifica el inhibidor de NFκB (IκBα) (Bredel et al. 2011).

Se ha descrito la sobreexpresión conjunta de **EGFR y SRC** en tumores humanos, asociada a un crecimiento tumoral descontrolado, así como un efecto sinérgico de ambas proteínas (Maa et al. 1995; Song et al. 2006; Zhang et al. 2004). Por otro lado, SRC es mediadora del tráfico de EGFR hacia la mitocondria y su interacción con CoxII, tras la estimulación con EGF, también se halla mediado por SRC (Cao et al. 2011; Yue et al. 2008) y permite la regulación del consumo de glucosa,

la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis (Boerner et al. 2004;Cao et al. 2011;Demory et al. 2009;Yue et al. 2008).

Se ha detectado la presencia de **EGFR y EGFRvIII en el núcleo** de células de GBMs primarios, en las que cooperan con STAT3 (de, I et al. 2008;Lo 2010). Asimismo, se ha caracterizado una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*) adyacente al dominio TM de EGFR (Hsu and Hung 2007), que permite su translocación desde la superficie celular al núcleo (Hubbard 2009;Lo 2010), donde mantendría su actividad quinasas, incrementando la proliferación celular a través de PCNA (del inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) (Wang et al. 2006) o modulando la respuesta al daño en el DNA a través de DNA-PK (del inglés *DNA-dependent protein kinase*)(Dittmann et al. 2005;Dittmann et al. 2007).

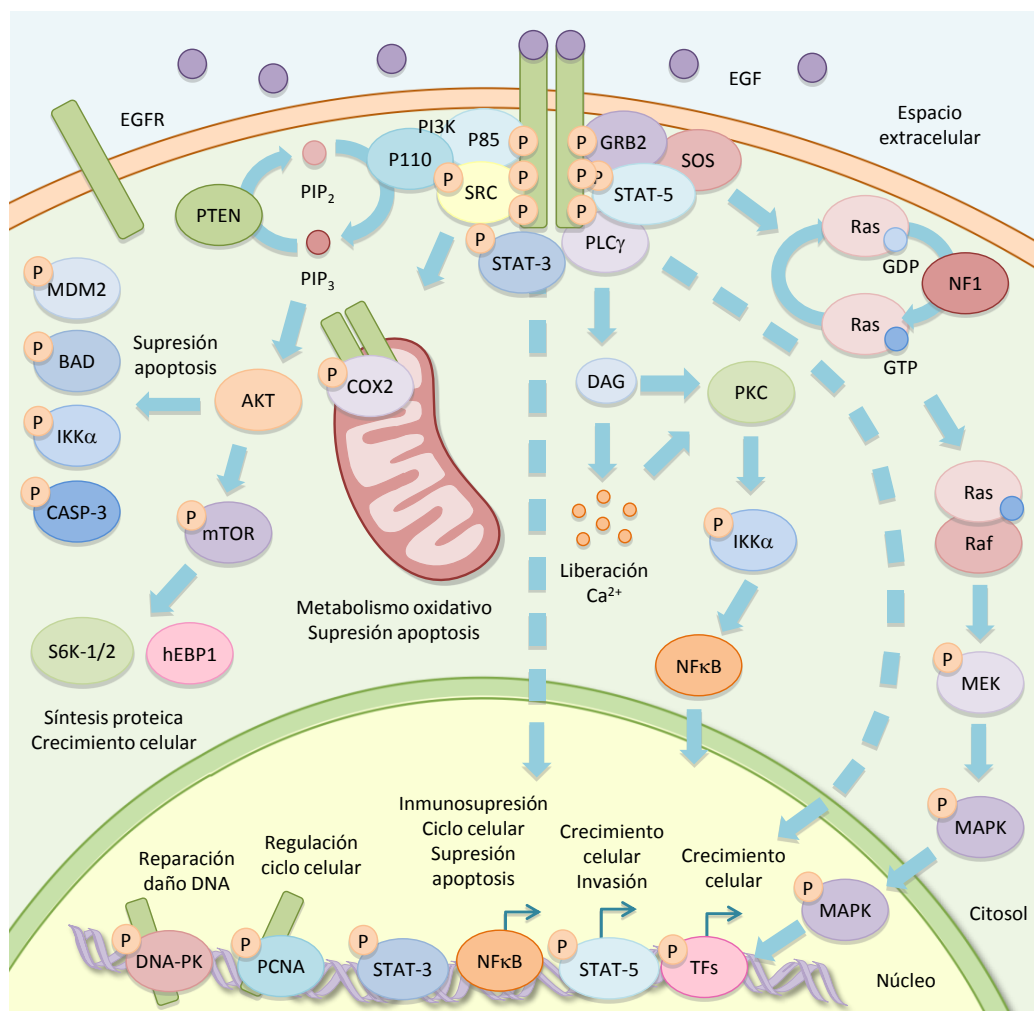


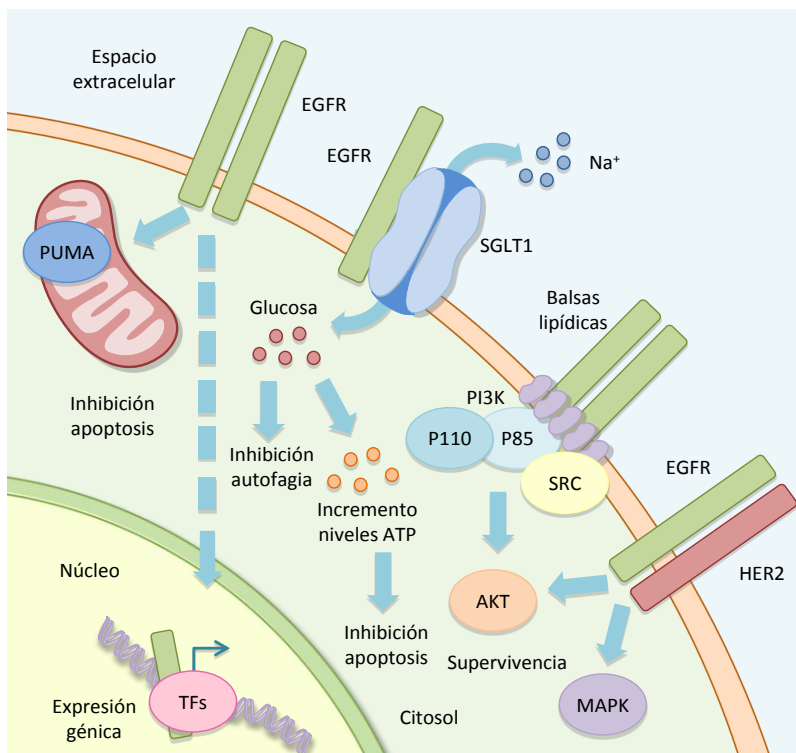
Figura 12. Vías de señalización de EGFR dependientes de la actividad quínasa del receptor. La interacción entre EGF y EGFR desencadena la fosforilación de varios residuos en el dominio intracelular del receptor y el reclutamiento de diversas moléculas adaptadoras capaces de activar una variedad de vías de señalización intracelulares que implican a MAPK/ERK, PI3K, STAT-3, PLCγ-PKC-NfκB y SRC, entre otros transductores de señales. Estos fenómenos de señalización tienen como resultado cambios en la síntesis proteica, el crecimiento celular, la supresión de la respuesta inmune y de la apoptosis y la alteración del metabolismo celular. Además, EGFR puede ser translocado al núcleo, donde tiene un efecto sobre la regulación del ciclo celular y la reparación del daño al ADN.

2.5 Señalización independiente de la actividad quinasa de EGFR

Los estudios sobre EGFR se han centrado principalmente en las vías de transducción de señales convencionales (inducidas tras la activación del receptor debido a su interacción con ligando), sin embargo, existen fuertes evidencias de que EGFR puede mediar procesos independientes de su actividad quinasa en diversos tipos de tumores (Han and Lo 2012). A continuación, se enumeran las principales funciones realizadas por EGFR independientes de su actividad quinasa (Figura I3).

EGFR es capaz de estabilizar a SGLT1 (del inglés *Sodium-glucose linked transporter 1*), un cotransportador de sodio y glucosa que mantiene los niveles intracelulares de glucosa, evitando la autofagia y la apoptosis (Weihua et al. 2008). La interacción entre **EGFR y SGLT1** es independiente de la estimulación por EGF y de la inhibición quinasa de EGFR (Ren et al. 2013). Se ha descrito la sobreexpresión de los SGLTs en distintos tipos de tumores y en algunos se ha correlacionado con la sobreexpresión de EGFR (Dittmann et al. 2013; Hanabata et al. 2012).

Las **balsas lipídicas** son microdominios especializados de la membrana celular, enriquecidos en esfingolípidos, colesterol y proteínas. Se ha propuesto que las balsas lipídicas actúan como una plataforma para la interacción de EGFR, SRC y PI3K, permitiendo la activación de AKT con independencia de la actividad TK de EGFR en células de cáncer de mama (Irwin et al. 2011). No



obstante, dicho mecanismo aún no ha sido descrito en GBM.

Figura I3. Vías de señalización de EGFR independientes de la actividad quinasa. El consumo de glucosa y la inhibición de la apoptosis mediada por la mitocondria son los principales procesos resultantes de la señalización a través de EGFR, con independencia de su actividad quinasa. Además EGFR se puede asociar con con HER2 o con SRC para activar señales de supervivencia y puede actuar como cofactor modulando la transcripción de diversos genes.

Se ha descrito la asociación de EGFR y EGFRvIII con la proteína pro-apoptótica PUMA (del inglés P53 upregulated modulator of apoptosis) por una vía independiente de la actividad TK del receptor (Zhu et al. 2010). Dicha interacción tiene como resultado la inhibición de la apoptosis

mitocondrial y es responsable de la resistencia de los GBMs a los agentes inductores de apoptosis (Zhu et al. 2010).

La forma nuclear de EGFR se definió inicialmente como un **cofactor transcripcional** con un dominio de transactivación en la región C-terminal y capaz de modular la expresión del gen *Ciclina D1* (Lin et al. 2001). Desde entonces se han descrito numerosas dianas transcripcionales de EGFR, implicadas en la progresión del ciclo celular y en la vía de señalización del ácido nítrico: iNOS (del inglés *Inducible nitric oxide synthase*) (Hanada et al. 2006), COX-2 (del inglés *Cyclooxygenase 2*) (Lo et al. 2010), la quinasa Aurora A (Hung et al. 2008) y c-Myc (Jaganathan et al. 2011). Dado que EGFR carece de dominio de unión a ADN, requiere la interacción con determinados factores de transcripción para realizar esta función.

2.6 Aproximaciones terapéuticas dirigidas contra EGFR

En los últimos años se han desarrollado estrategias muy diversas destinadas a bloquear la señalización de EGFR para ser empleadas como monoterapia o en combinación con RT y QT convencional. A continuación, se enumeran las principales aproximaciones que se están evaluando en ensayos preclínicos y clínicos con pacientes de GBM.

Los **anticuerpos monoclonales** (mAb, del inglés *monoclonal antibodies*) dirigidos contra EGFR tienen como principal objetivo bloquear la interacción receptor-ligando y la activación de las vías de señalización subyacentes. Actualmente se está evaluando la eficacia de cetuximab (Erbix®; Bristol-Myers Squibb, ImClone Systems) en un ensayo fase I/II con pacientes de GBM primario en combinación con RT y TMZ, y también como segunda línea de tratamiento en combinación con bevacizumab (mAb humanizado anti-VEGF) e irinotecan (inhibidor de la Topoisomerasa 1) (Combs et al. 2006; Hegi et al. 2012; Neyns et al. 2009). En paralelo, el mAb humanizado nimotuzumab (hR3, Theraloc®; YM BioSciences Inc.) ha mostrado cierto beneficio en pacientes de GBM en primera línea de tratamiento, en combinación con RT y QT, en un ensayo randomizado fase III (Bode et al. 2012). Por otro lado, el mAb806 es capaz de reconocer específicamente una región del receptor que se haya permanentemente expuesta en la forma EGFRvIII y de reducir la autofosforilación del receptor mutante (Luwor et al. 2001). La versión humanizada del mAb806 (ABT-806; Abbott) se ha empleado en diversos ensayos clínicos debido a su especificidad, gran biodistribución y tolerancia (Scott et al. 2007). No obstante, el uso de mAb en el tratamiento del GBM presenta ciertas desventajas entre las que destacan el elevado coste de producción y la dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica debido a su gran tamaño, en comparación con otras moléculas como los pequeños inhibidores de la actividad quinasa de EGFR.

La **inmunoterapia** permite eliminar las células tumorales con una toxicidad reducida. Las estrategias que existen actualmente en GBM se centran en actuar sobre la forma mutante EGFRvIII, ya que la pérdida de los exones 2 a 7 y la fusión de las dos regiones distantes en la forma salvaje del receptor genera una nueva secuencia de aminoácidos (PEPvIII) con la capacidad inmunogénica adecuada para las vacunas peptídicas (Choi et al. 2009). Un caso particular es rindopepimut (CDX-110, Celldex), una vacuna experimental que contiene la secuencia de aminoácidos PEPvIII unida a la proteína transportadora KLH (del inglés *keyhole limpet hemocyanin*), para generar una respuesta inmune humoral y celular. Esta aproximación ha mostrado eficacia en la eliminación de las células tumorales con expresión de EGFRvIII y su combinación con TMZ mejora la supervivencia libre de progresión (de 7,3 a 14,2 meses) la supervivencia mediana (15 a 26 meses) en los pacientes evaluados en ensayos clínicos fase II (Kanaly et al. 2010). No obstante, uno de los principales inconvenientes de esta aproximación es que la forma EGFRvIII tan solo se expresa en un determinado subgrupo de las células del tumor y queda por determinar si la vacuna es capaz de inducir la reducción a largo plazo de los tumores. Para evaluar su eficacia existen en el momento actual diversos ensayos clínicos fase III.

Las **pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa** (TKIs, del inglés *Tyrosine kinase inhibitors*) constituyen la terapia basada en EGFR más avanzada en la clínica. Se trata de moléculas sintéticas de bajo peso molecular, derivadas de la quinazolina y capaces de bloquear el bolsillo de unión de Mg^{2+} -ATP del dominio intracelular TK del receptor. Esta unión impide la activación de EGFR por autofosforilación inducida por ligando y la consecuente transducción de señales intracelulares (Wheeler et al. 2010). Las primeras TKIs utilizadas en la clínica para el tratamiento de gliomas de nuevo diagnóstico y recurrentes fueron las de primera generación, capaces de unirse a EGFR de manera reversible: gefitinib (Iressa®, ZD1839; AstraZeneca), erlotinib (Tarceva®, OSI774; Genentech), ambos específicos contra EGFR/HER1, y lapatinib (Tykerb/Tyverb; GSK), con capacidad para bloquear tanto EGFR/HER1 como HER2. Sin embargo, los prometedores resultados que han mostrado en ensayos preclínicos, no se han reproducido al ser testados en pacientes con GBM. A pesar de que erlotinib fue bien tolerado por los pacientes en varios ensayos clínicos, no proporcionó una mejora significativa de la supervivencia, sino tan solo una ligera mejora sobre el efecto del placebo (Raizer et al. 2010; van den Bent et al. 2009). Un resultado similar se obtuvo al evaluar gefitinib en un ensayo fase II en el que se observó que presentaba cierta actividad antitumoral en pacientes con GBM, aunque el beneficio clínico fue bastante limitado (Rich et al. 2004). Estos resultados condujeron al desarrollo de TKIs de segunda generación, capaces de unirse de forma irreversible a diversos receptores HER (inhibidores pan-HER). Entre ellos destacan afatinib (Gilotrif®, Boehringer Ingelheim), capaz de unirse a EGFR/HER1 y HER2, y dacomitinib (PF-0299804, Pfizer), que interacciona con EGFR/HER1,

HER2 y HER4, los cuales han mostrado cierta eficacia en el tratamiento de otros tumores y están siendo evaluados actualmente en ensayos clínicos con pacientes de GBM recurrente. En particular, dacomitinib presenta propiedades farmacocinéticas mejoradas respecto a los demás inhibidores entre las que destacan una mayor biodisponibilidad y una vida media más larga, en comparación con los inhibidores de primera generación. Dacomitinib ha mostrado actividad antitumoral en modelos de cáncer gástrico, de HNSCC (del inglés *head and neck squamous carcinoma*) y de NSCLC (del inglés *non-small cell lung cancer*), en los que ha sido capaz de reducir la proliferación celular y de limitar el crecimiento tumoral *in vivo* (Engelman et al. 2007;Gonzales et al. 2008;Nam et al. 2012). Además, se ha empleado en ensayos clínicos de distintos tipos de neoplasias (Janne et al. 2011;Ou 2012) y actualmente se está evaluando su eficacia en dos estudios fase II con pacientes de GBM recurrente con amplificación de *EGFR* (NCT01520870 y NCT01112527). Sin embargo, los ensayos preclínicos realizados sobre líneas celulares de GBM son muy limitados y se han desarrollado principalmente sobre líneas celulares establecidas, sin un análisis profundo del efecto de dacomitinib sobre los distintos componentes de la vía de señalización de EGFR (Zhu and Shah 2014).

3 DYRK1A

3.1 El gen *DYRK1A*

El gen *DYRK1A* (del inglés *Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A*) se localiza en la region q22.13 del cromosoma 21 humano (HSA21), en la denominada “región crítica del síndrome de Down” (DSCR, del inglés *Down síndrome critical region*). El gen *DYRK1A* consta de 12 exones que se expanden a lo largo de aproximadamente 149,7 Kb de ADN genómico y da lugar a diversos transcritos mediante *splicing* alternativo del gen (Becker et al. 1998;Guimera et al. 1999;Maenz et al. 2008).

3.2 La proteína *DYRK1A*: estructura, expresión, función y regulación

Las proteínas DYRKs constituyen una familia conservada de quinasas eucariotas, relacionadas estructuralmente con el grupo de quinasas CMGC que está integrado por las CDKs (del inglés *Cyclin-dependent kinases*), las MAPKs (del inglés *Mitogen-activated protein kinases*), las GSKs (del inglés *Glycogen synthase kinase*) y las CLKs (del inglés *CDC-like kinase*). En mamíferos la familia **DYRK** está compuesta por cinco miembros (*DYRK1A*, *DYRK1B*, *DYRK2*, *DYRK3* y *DYRK4*) que comparten un dominio conservado denominado “DYRK homology (DH)-box” situado en el centro de la estructura primaria de la proteína, cerca del dominio quinasa. *DYRK1A* contiene también una señal de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization signal*) que es funcional y se halla dividida en dos regiones de la proteína: una porción se localiza hacia la región N-terminal del dominio “DH-box” y la otra, entre los subdominios X y XI del dominio quinasa. En la

región C-terminal de la proteína se encuentra un motivo PEST (rico en prolina, ácido glutámico, serina y treonina), relacionado con el control de la estabilidad proteica (Alvarez et al. 2007). Además, dicha región contiene también una cola polihistidina, que actúa como señal de translocación nuclear, y una región rica en serina y treonina, sin función asociada.

La **expresión transcripcional** de *Dyrk1A* se produce en la mayor parte de los tejidos fetales y adultos (sobre todo en cerebro, corazón, pulmón y músculo esquelético) en los modelos animales estudiados (Guimera et al. 1996; Shindoh et al. 1996; Song et al. 1996). En el sistema nervioso central (SNC) se ha detectado DYRK1A en córtex, amígdala, hipocampo, tálamo y sustancia nigra (Wegiel et al. 2004) y se ha descrito el incremento de neuronas inmuno-positivas para DYRK1A con la maduración del cerebro, así como al aumento del porcentaje de astrocitos que contienen la proteína en personas de avanzada edad (Wegiel et al. 2004). En cuanto a su localización subcelular, DYRK1A se localiza tanto en el núcleo como en el citosol de las neuronas humanas, mientras que en astrocitos se halla exclusivamente en el citosol (Wegiel et al. 2004). Asimismo, en determinadas situaciones patológicas como la neurodegeneración asociada a la enfermedad de Alzheimer o al síndrome de Down (DS, del inglés *Down syndrome*), se ha detectado DYRK1A en ovillos neurofibrilares, gránulos originados por la degeneración granulovacuolar y cuerpos amiláceos (Wegiel et al. 2008).

La **función de Dyrk1A en el SNC** se ha asociado a procesos implicados en la plasticidad sináptica y la diferenciación neuronal en base a su expresión secuencial durante el desarrollo embrionario (Hammerle et al. 2008; Lepagnol-Bestel et al. 2009; Scales et al. 2009), su localización en regiones cerebrales implicadas en la cognición (hipocampo y el córtex) (Marti et al. 2003) y los resultados derivados de la alteración de la dosis génica de *Dyrk1A* en modelos murinos (Ahn et al. 2006; Altafaj et al. 2001). Adicionalmente, se ha asociado a los fenómenos de neuritogénesis y crecimiento axonal (Benavides-Piccione et al. 2005; Lepagnol-Bestel et al. 2009; Martinez de et al. 2012; Scales et al. 2009), con la regulación del ciclo celular en las células progenitoras neurales (mediante la regulación de la actividad de p53 y Ciclina D1, y de la expresión de *p21* y *p27*) (Park et al. 2010) y de la pluripotencia y diferenciación neuronal a través de NOTCH (Fernandez-Martinez et al. 2009; Hammerle et al. 2011) y NRSF (del inglés *neuron-restrictive silencer factor*)/REST (del inglés *RE1-Silencing Transcription factor*) (Canzonetta et al. 2008), o p120-catenina (Hong et al. 2012).

DYRK1A es una proteína quinasa dual, capaz de autofosforilarse en residuos tirosina. En particular, la autofosforilación en el residuo Y312/321 (variantes 754/763) del bucle de activación es necesaria para su completa actividad catalítica (Himpel et al. 2001; Lochhead et al. 2005) e independiente de otros dominios y cofactores (Gockler et al. 2009). Esta capacidad se pierde cuando la proteína se ha traducido por completo, momento desde el cual DYRK1A es capaz de

fosforilar exclusivamente los residuos de serina y treonina de sus sustratos. A diferencia de otras quinasas, **la regulación de DYRK1A** no se produce por fosforilación, sino que depende sobre todo del control de su expresión génica. Entre las proteínas encargadas de regular el promotor de *DYRK1A* destacan los siguientes factores de transcripción: AP-4 (del inglés *activating enhancer binding protein 4*) actúa como regulador negativo en células no neurales (Kim et al. 2006), E2F1 potencia la actividad del promotor de *DYRK1A* (Maenz et al. 2008) y NFATc1 aumenta los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *DYRK1A* en macrófagos de médula ósea (Lee et al. 2009). Además, existe una regulación de la estabilidad y actividad de DYRK1A mediante la interacción con otras proteínas. Así pues, la unión con la proteína 14-3-3b es capaz de duplicar dicha actividad (Alvarez et al. 2007), mientras que la proteína Sprouty2 (SPRY2 o SPRED1/2) puede unirse al dominio quinasa de DYRK1A a través de su dominio de unión EVH1 (del inglés *enabled/VASP homology 1 domain*) y compite por los sitios de unión a otros sustratos, inhibiendo su fosforilación (Li et al. 2010).

3.3 Inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A

La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A está ganando interés para el tratamiento de las alteraciones mentales asociadas a enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer) y al DS (Becker et al. 2014; Smith et al. 2012). DYRK1A representa una potente diana terapéutica debido a su actividad extremadamente dosis-dependiente, siendo el principal objetivo de los inhibidores lograr unos niveles de actividad similares a los existentes en condiciones no patológicas (limitando así los efectos secundarios derivados de su inhibición). Los inhibidores de DYRK1A son compuestos de bajo peso molecular capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y que compiten con el ATP mediante su unión al dominio quinasa de la proteína (competidores directos) o impidiendo la funcionalidad del sitio de unión al ATP (competidores indirectos) (Becker and Sippl 2011). Se pueden clasificar en función de su estructura química (Ionescu et al. 2012) o según su origen en inhibidores naturales, sintéticos y promíscuos (de amplio espectro con cierta actividad sobre DYRK1A). En la Tabla I1 se muestran los principales inhibidores, muchos de los cuales se han asociado con efectos beneficiosos en el tratamiento de distintos tipos de tumores. Esto sugiere una actividad oncogénica de DYRK1A, más allá del papel inhibidor de la proliferación en los progenitores neurales durante el desarrollo embrionario que se le ha atribuido principalmente (Becker and Sippl 2011; Ionescu et al. 2012).

Compuesto	Clase química	DYRK1A	IC ₅₀ (nM)	Otras dianas	Relación con tratamiento del cáncer	Referencias
Inhibidores naturales						
Harmina	β-carbolina	22-400		DYRK1B (166-300), DYRK2 (900-1,900), DYRK3 (800-1000), DYRK4 (80,000), MAO-A (5), CLK1 (27)	Inhibición de la angiogénesis Citotóxico en líneas celulares tumorales in vitro: glioma, leucemia, colon, gástrico e hígado, e <i>in vivo</i> : glioma	(Adayev et al. 2011;Bain et al. 2007;Bei et al. 2014;Dai et al. 2012;Eid et al. 2013;Kim et al. 1997;Pozo et al. 2013;Zhang et al. 2014)
EGCG	(Polifenol)	40-330		Vimentina (3), COMT (70)	Ensayos clínicos en cáncer: urotelial, vejiga, próstata, mieloma, mama y pulmón	(Bain et al. 2003;Chen et al. 2005;Yang et al. 2009)
Estaurosporina	Indolocarbazola glicosilada	20		Aurora A (7.2), Aurora B (20), Chk1 (1), Ftl3 (3), HGK (1), Ikkb (0.5), Jak2 (1), KDR (10), SYK (4)		(Sanchez et al. 2009)
Lameralinas	Cromenoindoles	40-5,000		CDK5 (720->10,000), GSK3 (>10,000),CDK1/Ciclina B, PIM1, CK1 (70-8,000)	Inducción de apoptosis y reversión del fenotipo de resistencia a fármacos	(Ballot et al. 2010;Baunbaek et al. 2008;Gallego et al. 2008)
INDY	Benzotiazol	200		DYRK1B (240)	Antiproliferativo en gliomas	(Ogawa et al. 2010;Pozo et al. 2013)
Meriolinas	Pirimidinilindol/azaindol	30		CDK1 (7-170), CDK2 (3-18), CDK5 (3-170), CDK9 (5.6-18), GSK3 (21-400), CK1 (50-200)	Antiproliferativo y proapoptótico en células y xenoinjertos de glioma	(Echalier et al. 2008;Jarry et al. 2014)
Variolina B	Pirimidinilindol/azaindol	80		CDK1 (60), CDK2 (80) CDK5 (90) CDK9 (26) GSK3 (70) CK1 (5)		(Echalier et al. 2008)
Meridianins	Pirimidinilindol/azaindol	34-900		CDK5 (680->10,000), CK1 (490->10,000), CLK1 (30-70)		(Akue-Gedu et al. 2009;Giraud et al. 2011)
KHCB19	dicloroindol	55		CLK1 (20), CLK3 (500)		(Fedorov et al. 2011)
Imidazolona	Leucetamina	70-1,000		CLK1 (15-71), GSK3(21-38)		(Debdabet al. 2010)
PurlavanoI A	Purina	300		CDK2 (30-100), PAK4 (100), SRC (<100), CDK2/CyclinA (100)		(Bain et al. 2003;Bain et al. 2007)
A-443654	Piridina	<10		DYRK2, DYRK3 (<100), ERK8, RSK1, RSK2, PKBa, PKBb, S6K1, PKA, ROCK2, PRK2, PKCa,PKD1,MSK1, SmMLCK, SK3b, CDK2-CyclinA, PIM1,2,3,MST2,HIPK2 (<100)	Identificado inicialmente como un potente inhibidor de AKT para su uso en el campo de investigación del cáncer	(Fala et al. 2008)
TBB, TBI, DMAT, TDI	Tetra halo-biciclos	100-10,000		DYRK2 (300-35,000), DYRK3 (2,000-5,000), CK2 (100-600), PIM1 (100-1,000), PIM2 (200-4,000), PIM3 (70-1,000)		(Adayev et al. 2011;Pagano et al. 2004;Pagano et al. 2008;Sarno et al. 2003)
Inhibidores promiscuos						

Tabla 11. Inhibidores de la actividad quinasa de DYRK1A. A la izquierda, IC₅₀ (nM) de los inhibidores de DYRK1A sobre la propia quinasa, otras proteínas de la familia DYRK y otras proteínas quinasa (únicamente aquellas con valores submicromolares). A la derecha, estudios relacionados con cáncer que se han desarrollado con los inhibidores.

4 La relación entre DYRK1A y EGFR

El papel de la proteína Dyrk1A como reguladora de la estabilidad de EGFR fue descrito inicialmente en NSCs de la zona subependimaria (SEZ, del inglés *subependimary zone*) de ratón, donde se determinó que Dyrk1A actúa inhibiendo la degradación de EGFR de manera dosis-dependiente (Ferron et al. 2010). La señalización mediada por EGF es necesaria para la autorrenovación de las células madre y se ha visto que niveles elevados de EGFR en las NSCs procedentes de la SEZ, tanto de animales post-natales como adultos, correlacionan con una mayor eficacia en la formación de neurosféricas (Pastrana et al. 2009; Soeda et al. 2008). Así pues, la caracterización de los ratones heterocigotos *Dyrk1A*^{+/-} mostró una menor cantidad de células madre con expresión de EGFR en las SEZ, así como la disminución de la capacidad de autorenovación de las NSCs de la SEZ *in vitro* al ser cultivadas en presencia del mitógeno EGF, efecto análogo al que se producía mediante la inhibición puntual de la expresión de Dyrk1A en los cultivos de NSCs de la SEZ de animales homocigotos *Dyrk1A*^{+/+}. El análisis de la expresión de EGFR mostró que la disminución de los niveles de Dyrk1A en las NSCs procedentes de animales *Dyrk1A*^{+/-} correlacionaba con una reducción de los niveles proteicos del receptor tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no en los niveles de ARNm, sugiriendo que la regulación de los niveles de EGFR por Dyrk1A debía producirse a través de un mecanismo postranscripcional. Dicha regulación permitía explicar la autorrenovación disminuida de las NSCs de ratones *Dyrk1A*^{+/-} en respuesta a EGF. Asimismo, se observó que los niveles de EGFR en la membrana de las NSCs correlacionaban con la capacidad de autorrenovación de las mismas y que dependían de la cantidad de Dyrk1A presente en las células. Dado que la presencia de EGFR en la membrana depende del balance entre la degradación y el reciclaje del receptor, era necesario esclarecer cual era el mecanismo por el cual Dyrk1A regulaba los niveles del receptor y como afectaba a la estabilidad del mismo. Los resultados obtenidos por Ferrón, S.R. y colaboradores muestran que, a nivel bioquímico, Dyrk1A antagoniza la degradación de EGFR tras su internalización mediante la fosforilación de Sprouty 2 (Spry2) (Ferron et al. 2010).

La familia de proteínas Spry están implicadas en la regulación de la señalización a través de los receptores tirosina quinasa (TKRs, del inglés *Tyrosine Kinase Receptor*), actuando como reguladores negativos de la activación de las MAPKs (Mason et al. 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que uno de los miembros de la familia Spry, Spry2, modula de manera positiva la señalización a través de EGFR, modulando la estabilidad del receptor (Cabrita and Christofori 2008). En esta misma línea, se ha descrito que Spry2 puede unirse con la proteína ligasa de ubiquitina Cbl (del inglés *Casitas B-lineage Lymphoma*) formando un complejo dependiente de fosforilación que bloquea la degradación de EGFR inducida por Cbl (Rubin et al.

2003;Wong et al. 2002). Además, se ha propuesto que Spry2 podría atenuar la degradación lisosomal de EGFR en respuesta a EGF a través de un mecanismo independiente de Cbl, mediante la fosforilación del residuo treonina T75 que modularía la unión de Spry2 a proteínas reguladoras del tráfico intracelular, de manera similar a lo descrito para los residuos de serina S112 y S121 (Kim et al. 2007). Dado que previamente se había identificado a Spry2 como un sustrato de Dyrk1A (Aranda et al. 2008), se analizó el papel de dicha proteína en la regulación de los niveles de EGFR y de la capacidad de autorrenovación de las NSCs de la SEZ. Los resultados obtenidos indicaron que la interacción de Dyrk1A con Spry2 y su posterior fosforilación en el residuo treonina T75, contribuían a la acumulación de EGFR en la membrana de las NSCs, incrementando su capacidad de autorrenovación en respuesta a EGF. Esta misma fosforilación es la que reduce la acción inhibitoria de Spry2 durante el proceso de activación de proteínas quinasa en respuesta a FGF (Aranda et al. 2008). En base a estos resultados, se podría proponer un modelo según el cual Dyrk1A actuaría como un modulador positivo de la señalización a través de ambos mitógenos, en función del contexto celular: antagonizando la acción inhibitoria de Spry2 en respuesta a FGF y atenuando la degradación de EGFR en respuesta a EGF, favoreciendo la unión de Spry2 a Cbl (Figura I4).

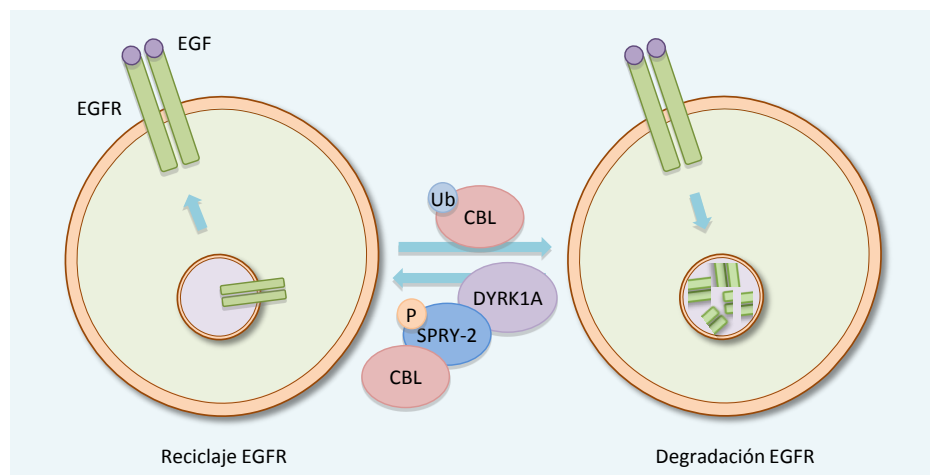
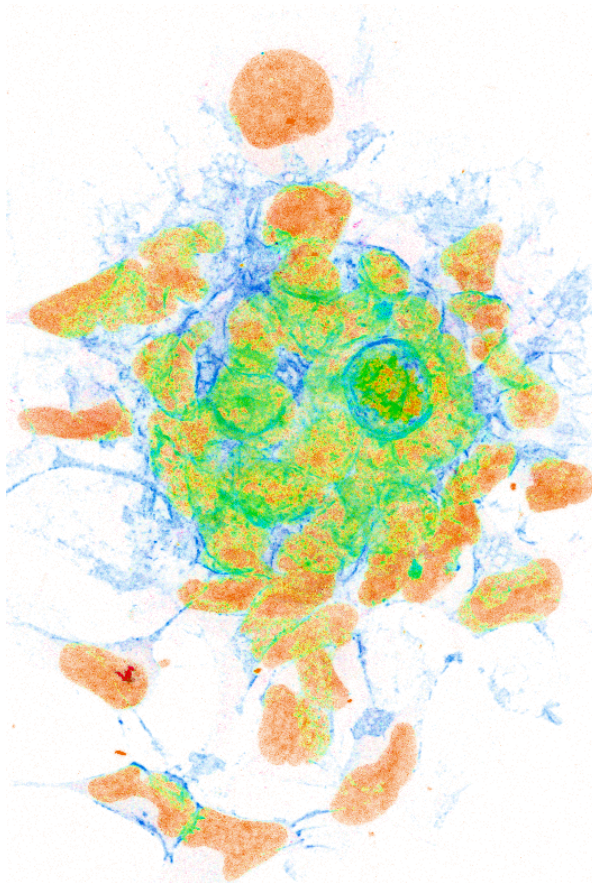


Figura I4. Relación entre DYRK1A y EGFR. Esquema ilustrativo del mecanismo molecular por el cual DYRK1A regula los niveles de EGFR en la membrana celular de las NSCs. DYRK1A fosforila a SPRY2 y este secuestra a c-CBL, favoreciendo el reciclaje del receptor hacia la membrana frente al proceso de degradación lisosomal del mismo.

5 Expresión de DYRK1A en GBM

Datos previos de nuestro grupo indicaban que la expresión de *DYRK1A* a nivel de ARNm se halla incrementada en el tejido procedente de muestras de gliomas de distinto grado en comparación con la expresión en el tejido cerebral normal (obtenido en cirugías de pacientes con epilepsia). Existe una cierta variabilidad en cuanto a los niveles de expresión de *DYRK1A* entre los distintos tipos de tumores gliales, siendo especialmente elevados en los oligodendrogliomas.

Además, cabe destacar que al analizar la expresión de *EGFR* en estos tejidos se observó una fuerte correlación entre los niveles de ARNm de *DYRK1A* y de *EGFR*. De hecho la expresión de *DYRK1A* es significativamente mayor en aquellos GBMs con amplificación de *EGFR*. Dicha correlación entre las dos moléculas se confirmó mediante inmunohistoquímica al detectar la expresión de *DYRK1A* a nivel de proteína en aquellas áreas de tumor positivas para el receptor (Pozo et al. 2013). Estos datos, junto con la relación entre *Dyrk1A* y *EGFR* en NSCs de la SEZ de ratón sugieren un papel relevante de *DYRK1A* en aquel subgrupo de GBMs dependientes de *EGFR*.



OBJETIVOS

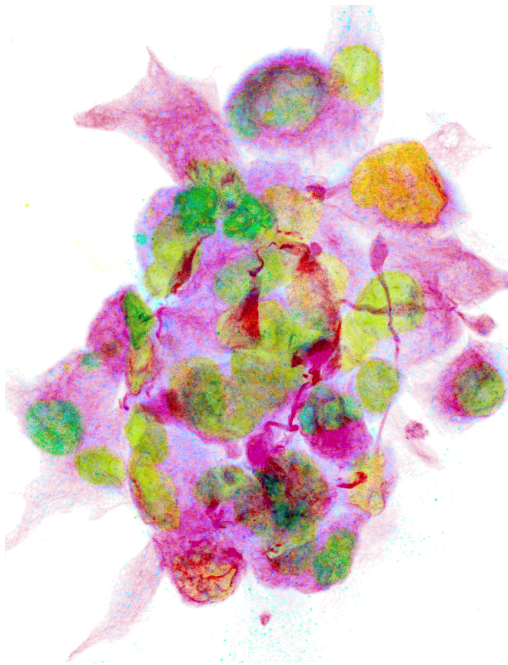
El trabajo experimental desarrollado en la presente tesis se ha centrado en la caracterización de dos nuevas aproximaciones terapéuticas dirigidas a la inhibición de EGFR en GBM. Los ensayos realizados se pueden englobar en dos grandes bloques:

En primer lugar, los centrados en la inhibición de la actividad quinasa de EGFR en presencia de dacomitinib, que ha demostrado eficiencia en otros tipos tumorales y en algunas líneas establecidas de GBM, pero sólo *in vitro* y sin un análisis detallado de la vía de señalización activada por el receptor.

En segundo lugar, los dirigidos a inhibir la actividad quinasa de DYRK1A, como una forma indirecta de bloquear a EGFR induciendo la degradación del mismo.

Los principales objetivos que se han abordado se enumeran a continuación:

- **Analizar** el efecto de la inhibición irreversible de EGFR mediante el uso de dacomitinib en cultivos primarios de TICs de GBM.
- **Evaluar** la capacidad antitumoral *in vivo* de dacomitinib en modelos de xenoinjertos orto y heterotópicos de GBM.
- **Caracterizar** la función de DYRK1A como regulador de la expresión de EGFR en cultivos primarios de GBM mediante su inhibición genética y farmacológica.
- **Determinar** el efecto antitumoral de la inhibición genética y farmacológica de DYRK1A en modelos de xenoinjertos orto y heterotópicos de GBM.



MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M1. Reactivos utilizados en las técnicas descritas en este apartado.

Reactivo	Proveedor
Ácidos, disolventes, sales	Panreac, Sigma, Merck
Material fungible	Nunc, Falcon, Costar, DeckWorks, Corning
Biología molecular	
Albumin Standard	Thermo Scientific, 23209
Ammonium persulfate (APS)	Sigma, A3678
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo, 23225
Albumin from Bovine Serum (BSA)	Sigma-Aldrich, A7906
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, 12604600
RNase-Free DNase Set	Qiagen, 79254
GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, G1N70
Immobilion™ Western Chemiluminiscent HRP substrate	Millipore, WBKL50100
Leche en polvo desnatada	Sveltesse
LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white	04729692001
Protogel 30% Acrylamide: 0,8% Bis-Acryl-amide Stock solution	Roth, 3029.1
Membrana nitrocelulosa Hybond ECL	Amersham, RPN203D
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma, T7024
Medical X-Ray Film	AGFA, ENKMV
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo, 26619
PMSF	Sigma, 93482
Prestained Protein MW Marker	Thermo, 26612
RNase-Free DNase Set	Qiagen, 79254
RNeasy mini kit	Qiagen, 74104
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	Sigma, L3771
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, 18064-014
Syber Premix Ex Taq	Takara, RR041A
Tween 20	Sigma, P2287

Cultivos celulares

Accumax	Millipore, SCR006
B27 Supplement	Gibco, 17504-044
BD Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced	BD, 354230
Bovine Serum Albumin (BSA) for cell culture	Sigma-Aldrich, A9418
Cell proliferation reagent WST-1	Roche, 05015944001
Cycloheximide	Sigma, C1988
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma, D2650
Dacomitinib	Pfizer, PF-00299804
DMEM	Lonza, BE12-604F
Doxycycline hyclate	Sigma, D9891
Fetal Bovine Serum (FBS)	Lonza, DE14-701F
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, 171440-02
Freezing medium, serum free	IBIDI, 80022
Glutamax	Gibco, A12860-01
Harmine hydrochloride	TCI Europe, H0002
Heparina	Sigma, H3149
Hepes Buffer 1M	Invitrogen, 1530056
INDY	Dr. Masatoshi Hagiwara (Universidad de Kyoto, Japón)
L-Glutamine 200 mM	Lonza, BE17-605E
Neurobasal	Gibco, 21103-149
10X DPBS	Lonza, 17-515Q
Penicillin/Streptomycin	Lonza, DE17-602E
Polybrene	Sigma, H9268
Recombinant human EGF	Peptotech, AF-100-15
Recombinant human basic FGF	Peptotech, AF-100-18 B
Trypan Blue cell culture tested	Sigma, 02596LH

Ensayos *in vivo*

Antisedan	Esteve
Dotarem (Gd-DOTA)	Guerbet
Hystoacryl	B-Brawn, 1050052
Imalgene	Meril Laboratorios
Isobavet	Schering-plough
Lubrithal	Laboratorio DECHRA
Metacam	Boehringer Ingelheim
Sondas intragástricas	Fine Science Tools
Xylacine	Calier

Histología e inmunofluorescencia

Azida sódica	Panreac,
Bromodeoxyuridine	Sigma, B5002
Cubreobjetos circulares 12 mm	LINEA LAB, 12CIR -1
4'-6-Diamindino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI)	Sigma, D9542
EGF Alexa Fluor 488	Molecular Probes , E-13345
Fluromount	Cultek, 0100-01
Gelatina	Sigma-Aldrich
LysoTracker Red	Molecular Probes, L-7528
O.C.T. Compound	Tissue-Tek, 62550-01
Parafilm	Sigma, P7793-1EA
Paraformaldehyde	Panreac, 141451
Triton X-100	Sigma, X100

Tabla M2. Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qRT-PCR con ADNc.

Gen	Secuencia cebadores 5' → 3'
<i>CD133</i>	Fw-GCCACCGCTCTAGATACTGC; Rv-TGTTGTGATGGGCTTGTCAT
<i>DYRK1A</i>	Fw-GCAATTCCTGCTCCTCTTG; Rv-TTACCCAAGGCTTGTTGTCC
<i>EGFR</i>	Fw-CAGCGCTACCTTGTCATTCA; Rv-AGCTTTGCAGCCCATTCTA
<i>EGFRvIII</i>	Fw-GGCTCTGGAGGAAAAGAAAGGTAAT; Rv-TCCTCCATCTCATAGCTGTGC
<i>GFAPα</i>	Fw-ACATCGAGATCGCCACCTAC; Rv-ATCTCCACGGTCTTCACCAC
<i>GFAPδ</i>	Fw-ACATCGAGATCGCCACCTAC; Rv-CGGCGTTCCATTTACAATCT
<i>GIRDIN</i>	Fw-TCAAAAGGCTGCAACAAGAGAAC; Rv- TCGAAGTGCATCTAATTCATCTCG
<i>HPRT-I</i>	Fw-TGACACTGGCAAAACAATGCA; Rv-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>LIF</i>	Fw-CATGAACCAGATCAGGAG; Rv-GCTGTGTAATAGAGAATAAAGAG
<i>Nanog</i>	Fw-AGAAGGCCTCAGCACCTAC; Rv-GGCCTGATTGTTCCAGGA
<i>OSP</i>	Fw-TGACCTGCGGCTACACCATCC; Rv-AGGCACAGCACAGCACCAATCC
<i>βIIIαTubulin</i>	Fw-AGTGATGAGCATGGCATCGA; Rv-AGGCAGTCGCAGTTTTTCA

Tabla M3. Condiciones empleadas en las qRT-PCRs sobre ADNc y las qPCRs sobre ADNg.

Desnaturalización inicial (1 ciclo)			
95 °C	10 min	20 °C /s	sin lectura
Curva de amplificación (45 ciclos)			
95 °C	10 s	20 °C /s	sin lectura
55-60 °C (Tm según el gen)	10 s	20 °C /s	sin lectura
72 °C	10 s	20 °C /s	lectura simple
Curva de disociación (1 ciclo)			
95 °C	0 s	20 °C /s	sin lectura
Tm + 5 °C	15 s	20 °C /s	sin lectura
95 °C	0 s	0,1 °C /s	lectura continua
40 °C	30 s	20 °C /s	sin lectura

Tabla M4. Secuencias de los cebadores específicos empleados en las reacciones de qPCR con ADNg.

Gen	Secuencia cebadores 5'→3'
<i>GAPDH</i>	Fw-ACCCACTCCTCCACCTTTG; Rv-CTCTTGTGCTCTTGCTGGG
<i>EGFR</i>	Fw-GTGCAGATCGCAAAAGGTAATCAG; Rv-GCAGACCGCATGTGAGGAT

Tabla M5. Condiciones empleadas en la qRT-PCR para la detección de la forma EGFRvIII.

Desnaturalización inicial (1 ciclo)			
95 °C	10 min	20 °C /s	sin lectura
Curva de amplificación (45 ciclos)			
95 °C	10 s	20 °C /s	sin lectura
60 °C	10 s	20 °C /s	sin lectura
72 °C	10 s	20 °C /s	sin lectura
82 °C	10 s	20 °C /s	lectura simple
Curva de disociación (1 ciclo)			
95 °C	0 s	20 °C /s	sin lectura
65 °C	15 s	20 °C /s	sin lectura
95 °C	0 s	0,1 °C /s	lectura continua
40 °C	30 s	20 °C /s	sin lectura

Tabla M6. Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunodetección.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución uso	Proveedor	Referencia
β -Actin	ratón	1:1000 (WB)	Sigma	A5441
Akt	conejo	1:1000 (WB)	Cell Signaling	#9272
BrdU	ratón	1:300 (IF)	Dako	M 0744
CD133/2-PE	ratón	1:10 (FC)	Milteny Biotec	130-098-046
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	conejo	1:200 (IF)	Cell Signalling	#9664
DYRK1A	ratón	1:1000 (WB)	Abnova	H00001859-M01
DYRK1A	conejo	1:200 (IF), 1:500 (WB)	Cell Signalling	#2771
EGFR	conejo	1:500 (WB)	Cell Signalling	#2232
EGFR-FITC	rata	1:10 (FC)	Abcam	ab11400
GADPH	ratón	1:1000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724
ERK1/2	conejo	1:1000 (WB)	Cell Signalling	#4695
P53	ratón	1:500 (WB)	Dako	M 7001
Phospho-Akt (Ser473)	conejo	1:1000 (WB)	Cell Signalling	#4060
Phospho-EGFR (Tyr1045)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling	#2237
Phospho-EGFR (Tyr992)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling	#2235
Phospho-EGFR (Tyr1068)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling	#3777
Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	conejo	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Cell Signalling	#4370
Phospho-c-Jun (Ser73)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signalling	#3270
Phospho-GSK-3 β (Ser9)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signalling	#5558
Phospho-mTOR (Ser2448)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signalling	#5536

Phospho-p90RSK (Ser380)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signalling	#9335
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	conejo	1:500 (WB), 1:100 (IF)	Cell Signaling	#4858
Phospho-Smad2 (Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling	#8828
Phospho-Stat3 (Ser727)	conejo	1:500 (WB)	Cell Signaling	#9134
PTEN	conejo	1:1000 (WB)	Cell Signaling	#9552S
Sprouty-2	conejo	1:1000 (WB)	Millipore	07-125
Vimentin (V9)	ratón	1:300 (IF)	Santa Cruz Biotechnology	sc-6260

Tabla M7. Anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunodetección.

Anticuerpos secundarios	Especie	Dilución uso	Proveedor	Referencia
Dylight 488 anti ratón IgG	burro	1:500 (IF)	Jackson ImmunoResearch	715-486-150
Dylight 488 anti conejo IgG	burro	1:500 (IF)	Jackson ImmunoResearch	715-486-152
Cy3 anti ratón IgG	cabra	1:1500 (IF)	Jackson ImmunoResearch	115-166-062
Cy3 anti conejo IgG	burro	1:1500 (IF)	Jackson ImmunoResearch	711-486-152
HRP anti ratón IgG	oveja	1:50.000 (WB)	GE Healthcare	NA931
HRP anti conejo IgG	burro	1:5000 (WB)	GE Healthcare	NA934
HRP anti conejo IgG	cabra	1:2000 (WB)	Cell Signaling	#7074

1 Cultivos celulares

1.1 Establecimiento y mantenimiento de los cultivos primarios de TICs de GBM

1.1.1 Recogida de muestras tumorales

Tres de las líneas primarias de GBM utilizadas en este trabajo fueron cedidas por la Dra. Mazzolen del San Raffaele Scientific Institute de Milán. El resto de las líneas se generaron a partir de tumores extraídos en el Hospital 12 de Octubre (Madrid). Las muestras tumorales procedentes de cirugías de pacientes con GBM fueron recogidas en los quirófanos de dicho hospital durante el procedimiento de resección de la neoplasia. El tejido se conservó en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*, Lonza) a 4 °C hasta su procesamiento en las instalaciones del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid). El diagnóstico anatomopatológico de cada muestra fue realizado en el servicio de Neuropatología del Hospital 12 de Octubre. Las muestras fueron colectadas con el consentimiento informado de los pacientes, respetando los principios de la Declaración de Helsinki.

1.1.2 Establecimiento de cultivos primarios a partir de las muestras tumorales

Las muestras de GBM humanos fueron disgregadas mecánicamente con un bisturí en una placa de cultivo conteniendo medio DMEM. A continuación, los pequeños trozos de tejido fueron colectados en un tubo estéril y centrifugados durante 5 minutos a 1000 rpm. Se aspiró el sobrenadante y el tejido fue disgregado enzimáticamente con un volumen variable de 5 a 10 mL de Accumax (Millipore), en función de la cantidad de tejido de la que se disponía, durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación orbital a 120 rpm. A continuación, se añadió medio DMEM y se centrifugó de nuevo. La suspensión celular obtenida fue filtrada a través de filtros estériles de 30 µm (Partec), que tan solo permitían el paso de las células individuales resultantes de la disgregación del tejido. Seguidamente, se procedió a la purificación de las células tumorales filtradas mediante una centrifugación con gradiente de Ficoll (GE Healthcare) durante 30 min a 300 g, sin aceleración ni deceleración. Este proceso permitió eliminar la mayor parte de los eritrocitos presentes en la suspensión celular obtenida a partir de la muestra tumoral. Las células tumorales purificadas fueron sembradas en medio completo (MC): Neurobasal (Life Technologies), B27 (Life Technologies), Glutamax (Life Technologies) y Penicilina-Estreptomicina (Lonza), suplementado con 0,7 unidades/mL de heparina (Sigma-Aldrich), 40 ng/mL de EGF (Preprotech) y 20 ng/mL de bFGF (Preprotech) (MC-SUP, medio completo suplementado) a una densidad de 50.000 células vivas/mL. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

1.1.3 Mantenimiento y expansión de los cultivos primarios

La tasa de proliferación de los cultivos primarios presentaba cierta variabilidad, de manera que el intervalo temporal entre los pases celulares osciló entre los 7 y 14 días aproximadamente, tomando como referencia para el pase el tamaño de las esferas. Estas se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en un volumen variable de la solución enzimática Accumax en función del tamaño del cultivo. Tras 3 min de incubación en dicha solución, se procedió a la disgregación mecánica de las esferas haciéndolas pasar a través de la punta de una micropipeta p200 de 15 a 20 veces evitando la generación de turbulencias.

Las células viables se contaron utilizando una cámara de Neubauer y azul de tripano 0,1 % (p/v, en suero salino) para identificar las células muertas. Finalmente, las células fueron sembradas de nuevo en MC-SUP a una densidad de 50.000 células viables/mL para la expansión del cultivo.

1.1.4 Criopreservación y descongelación de los cultivos

Para la criopreservación de los cultivos de neuroesferas de GBM se sembraron 750.000 células recién disgregadas en frascos de cultivo de 75 cm², y tras 72 h en cultivo (cuando las esferas eran de tamaño medio) se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron suavemente en medio de congelación celular (Ibidi) para ser transferidas a criotubos. A continuación, los viales fueron ubicados en un recipiente con isopropanol (Mr. Froosty, Sigma) que se mantuvo a - 80 °C durante 24 h para permitir un descenso lento de la temperatura (de aproximadamente 1 °C/min) hasta su congelación. Seguidamente, los criotubos se trasladaron a tanques de nitrógeno líquido (N₂) para su almacenaje durante largos periodos de tiempo.

La descongelación de las neuroesferas de GBM se realizó de la forma más rápida posible. Para ello, se incubaron los criotubos, recién extraídos de los tanques de N₂, en un baño termostático a 37 °C durante aproximadamente 1 min hasta su descongelación. A continuación, la suspensión celular recién descongelada fue transferida rápidamente a un tubo estéril con 5 mL de DMEM-BSA precalentado y se centrifugó 5 min a 1000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en MC-SUP y se sembró en un frasco de 25 cm².

1.2 Transducción de cultivos celulares con lentivirus

1.2.1 Vectores retrovirales y lentivirales

La interferencia inducible de *DYRK1A* se realizó mediante el uso del vector lentiviral *pTRIPZ* lentiviral *shRNAmir* (clon V3THS-376671, Open Biosystems) (Figura M1A). En dicha construcción la expresión del el ARNsh (del inglés *short hairpin*) para la interferencia específica de *DYRK1A* está regulada mediante el sistema Tet-On. En este sistema el transactivador rtTA3 (del inglés *reverse tetracycline transactivator*) se une al promotor TRE (del inglés *tetracycline response element*) y

activa la transcripción del ARNsh en presencia de doxiciclina. Además, el vector contiene el gen que codifica la proteína reportera TurboRFP (del inglés *Red fluorescent protein*) cuya expresión está regulada también por el sistema Tet-On, de manera que la expresión de la proteína fluorescente se produce al mismo tiempo que la interferencia de *DYRK1A*. La presencia de un gen de resistencia a puomicina permitió la selección de aquellas células que hubiesen incorporado la construcción lentiviral de manera estable mediante la adición del antibiótico en el medio de cultivo.

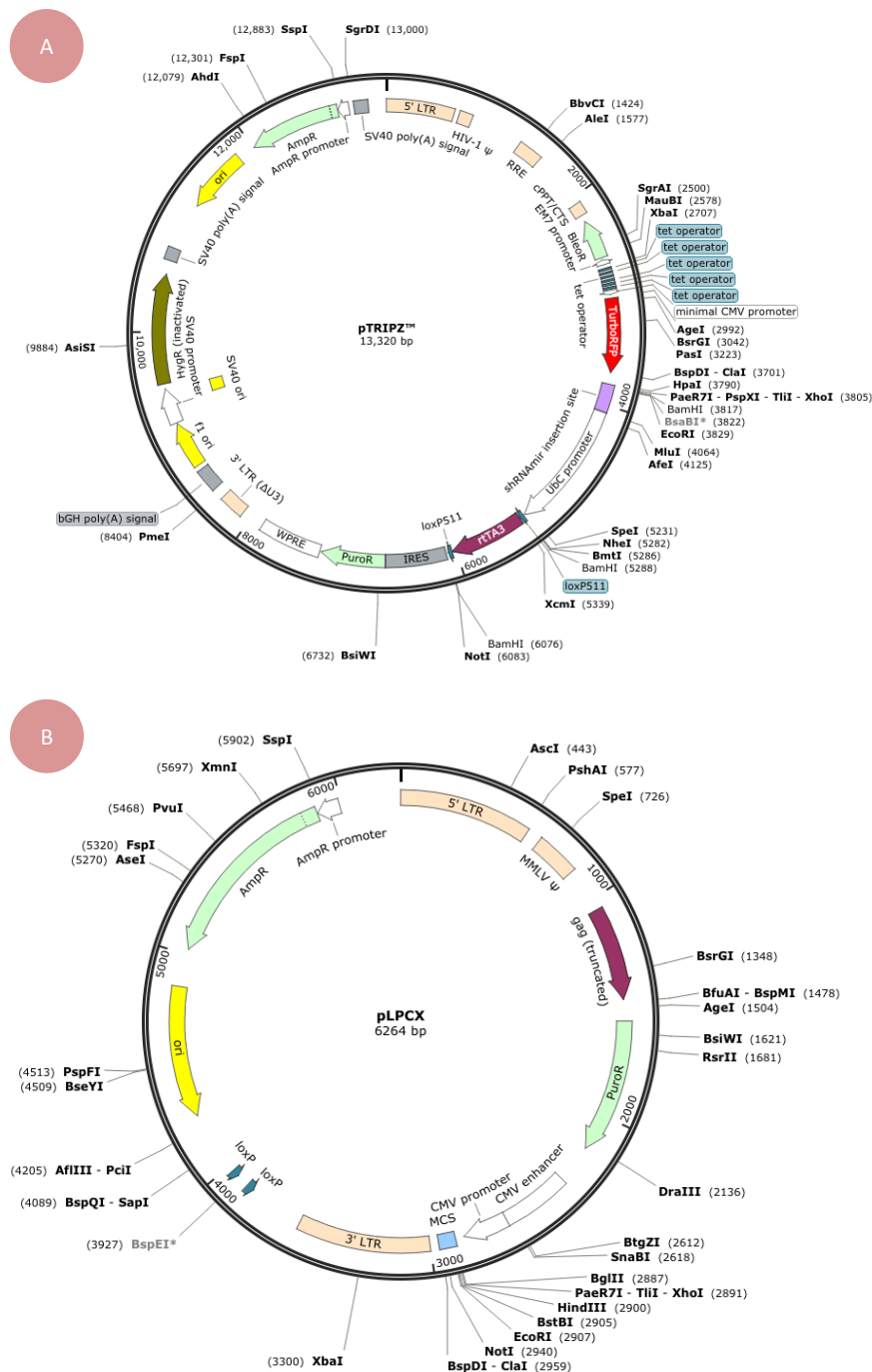


Figura M1. Mapas de los vectores virales. (A) Esquema del vector lentiviral *pTRIPZ* empleado para el silenciamiento de la expresión de *DYRK1A*. (B) Esquema del vector retroviral *pLPCX* utilizado para la sobreexpresión de *SPRY2* en las células de GBM. En ambos casos se muestra la estructura del vector vacío.

Los ensayos de sobreexpresión de *SPRY2* se llevaron a cabo mediante la utilización del vector retroviral *pLPCX-SPRY2*, utilizando en paralelo el vector vacío *pLPCX* (Clontech) como control, ambos cedidos por el Dr. J.M. Rojas del ISCIII (Majadahonda, Madrid). En este caso, la expresión del gen *SPRY2* está regulada por el promotor CMV (de citomegalovirus) y se produce constitutivamente en las células que han incorporado el vector y han sido seleccionadas mediante la adición de puomicina al medio de cultivo, ya que la construcción retroviral presenta en su secuencia un gen de resistencia a dicho antibiótico.

1.2.2 Mantenimiento y expansión de los cultivos de células empaquetadoras 293T

Las células 293T (ATCC) se crecieron adheridas al plástico y en un medio de cultivo compuesto por DMEM (Lonza), 10 % de suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y 50 unidades/mL de penicilina/estreptomicina (Invitrogen). El mantenimiento de los cultivos se realizó mediante el pase de los mismos unas dos veces por semana, evitando que alcanzaran el 100 % de confluencia. En el momento del pase celular, se realizó un lavado con PBS 1X (del inglés *phosphate buffered saline*) de la monocapa celular y se despegó del plástico mediante la incubación con tripsina 0,5 %/EDTA 0,2 % (del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*) durante 3 min a 37 °C. Seguidamente, se comprobó al microscopio que las células se habían despegado del sustrato y se colectaron en un tubo al que se añadió 5 mL de medio de cultivo para inhibir la digestión enzimática. La suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 1.000 rpm y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron a la concentración deseada. El medio de cultivo, el PBS 1X y la tripsina habían sido previamente atemperados a 37 °C en un baño termostático.

1.2.3 Transfección de células 293T para la producción de retrovirus y lentivirus anfotrópicos

La generación de partículas retro y lentivirales se realizó mediante el uso de las células empaquetadoras 293T. Con esta finalidad, se sembraron 10^6 células viables en cada placa P100 y transcurridas 24 h se comprobó que habían alcanzado el 70 % de confluencia, estado óptimo para la transfección de las mismas. El medio de crecimiento de las células se reemplazó por medio fresco antes de realizar la transfección mediante fosfato cálcico. Para ello, se preparó en un tubo 1 mL de HBS 2X (del inglés *Hepes Buffered Saline*) (NaCl 281 mM, HEPES 100 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM a pH 7,2) y en otro, 1 mL de solución compuesta por CaCl_2 0,025 M y una cantidad variable de 15 a 20 µg de ADN plasmídico. En cada transfección se emplearon tres plásmidos: el plásmido viral de interés, el plásmido que codificaba las proteínas de la cápside viral (*PM2.G Envelope*) y el plásmido que codificaba las proteínas del core del virus (*psPAX2*). A continuación, se burbujeó la solución con el ADN utilizando una pipeta Pasteur de vidrio mientras se fue añadiendo el HBS 2X

gota a gota, dejándolo resbalar por la pared del tubo. Tras ser incubada durante 10 min a temperatura ambiente, la solución resultante de dicho proceso se añadió a las células 293T, gota a gota por toda la superficie de la placa de cultivo. Las placas se mantuvieron en el incubador y 6 h después de la transfección se reemplazó el medio de cultivo por 10 mL de MC-SUP fresco. Transcurridas 48 h se colectó el medio de cultivo y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm. El sobrenadante resultante se pasó a través de un filtro de 0,45 μ M acoplado a una jeringa de 20 mL para eliminar la contaminación con células empaquetadoras y obtener una suspensión purificada de partículas víricas.

1.2.4 Transducción de los cultivos primarios de GBM con retrovirus y lentivirus

Las esferas de TICs de GBM en cultivo se disociaron y las células individuales resultantes se sembraron a una densidad de 50.000 céls./mL. Transcurridas 24 h desde la siembra, y habiendo alcanzado las esferas un tamaño adecuado para la transducción de las mismas, se colectaron y centrifugaron a 800 rpm durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron directamente en el sobrenadante viral diluido a partes iguales con MC-SUP. A las 12 h, se reemplazó el medio que contenía las partículas virales por MC-SUP fresco. En el caso de la transducción con lentivirus, se añadió 5 μ g/mL de polibreno al medio para incrementar la eficiencia de infección.

La selección de las células que habían sido transducidas por las partículas virales se realizó mediante la adición al medio de cultivo de 2 μ g/mL del antibiótico puromicina, de manera que tan solo las células que hubiesen incorporado la construcción viral (portadora de la resistencia a puromicina) de manera estable a su genoma fueron capaces de sobrevivir. La selección con puromicina se mantuvo durante el tiempo en el que se realizaron dos pases de las neuroesferas (aproximadamente unas 2 semanas).

1.2.5 Inducción de la expresión de *shRNA^{mir}* en presencia de doxíciclina

En el caso de las células transducidas con la construcción lentiviral *pTRIPZ lentiviral shRNA^{mir}*, a las que se denominará GBM-DYRK1Ash, se comprobó la inducción de la expresión del *shRNA^{mir}* junto con la de la proteína reportera fluorescente TurboRFP mediante la adición del antibiótico doxíciclina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 μ g/mL en el medio de cultivo. Transcurridas 24 h desde el momento de la estimulación de los cultivos con el antibiótico, estos fueron observados en el microscopio invertido de fluorescencia (ZEISS Axiovert 40 CFL) para detectar la expresión de la proteína TurboRFP que experimenta una excitación máxima a 553 nm y cuya emisión máxima se produce a 574 nm.

2 Análisis de expresión

2.1 Análisis de expresión génica por medición de ARN mensajero (ARNm)

2.1.1 Extracción del ARN total

La extracción de ARN total a partir de muestras de cultivos celulares y de tejido tumoral (previamente conservados a - 80 °C) se realizó mediante el uso de los kits comerciales RNeasy mini (Qiagen) y High Pure RNA Isolation (Roche). Durante el protocolo de extracción se efectuó un tratamiento con ADNasa (Qiagen), con la finalidad de eliminar el ADN genómico presente en el extracto obtenido. La calidad del ARN obtenido se determinó cualitativamente mediante la separación de una pequeña cantidad del mismo en un gel de agarosa al 1% (p/v) y la observación de las bandas correspondientes a los ARNs ribosómicos 18S y 28S. La cantidad de ARN total se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro (Infinite M200, TECAN).

2.1.2 Obtención de ADN complementario (ADNc) y qRT-PCR

Una cantidad variable entre 250 ng y 1 µg de ARN total se retrotranscribió a ADNc en un volumen total de reacción de 20 µL, conteniendo 4 µL de First Strand Buffer 5x, 1 mL de inhibidor de ARNasa, 2 µL de DTT 0,1 M, 2 mL de dNTPs 10 mM y 1 µL de enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Las muestras se incubaron a 42 °C durante 1 h. El ADNc resultante fue diluido de 2 a 10 veces, en función de la cantidad de ARN total utilizado como sustrato, en agua libre de nucleasas y conservado a - 20 °C hasta su uso.

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*) se realizaron en capilares utilizando el aparato LightCycler1.5 o en placas de 96 pocillos utilizando el aparato LightCycler 480, ambos de Roche. La reacción de qRT-PCR se realizó en un volumen total de 10 µL conteniendo 5 µL de la enzima SYBR Premix Ex Taq (Takara), 0,2 µL de la dilución 10 µM de los cebadores específicos (Tabla M2), 2,6 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADNc molde previamente diluido. Las condiciones empleadas en todas las qRT-PCRs se describen en la Tabla M3, siendo la temperatura de fusión (T_m , del inglés *melting temperature*) la única variable modificada en función del gen de estudio. La expresión génica se cuantificó mediante el método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), utilizando los niveles de expresión del gen HPRT como control interno de expresión. Se utilizó como normalizador el ADNc obtenido a partir de una muestra de tejido cerebral normal, no tumoral. En el caso del análisis de expresión en los xenoinjertos de ratón tratados con dacomitinib los niveles de expresión génica se representaron gráficamente mediante de “mapas de calor” con ayuda del programa Excel. Se trata de la representación gráfica que colorea la expresión génica, siendo de color rojo aquellos

genes con expresión más elevada, de color amarillo los que presentan una expresión media y de color verde aquellos con una menor expresión a nivel de ARNm.

Para determinar la presencia de la forma mutante *EGFRvIII* se utilizaron cebadores que hibridan a ambos lados de la delección (exón 2 y exón 7) de manera que mediante qRT-PCR sólo se podía detectar la amplificación en el caso de que exista la delección (Yoshimoto et al. 2008). Con el fin de minimizar la presencia de productos inespecíficos se emplearon unas condiciones de qRT-PCR más restrictivas que las utilizadas para los demás genes analizados (Tabla M5).

2.2 Análisis de dosis génica

2.2.1 Extracción de ADN genómico (ADNg) y qPCR

La extracción del ADN genómico de a partir de muestras de cultivos celulares y de tejido tumoral (previamente conservados a - 80 °C) se realizó siguiendo las instrucciones del kit GenElute Mammalian Genomic ADN (Sigma-Aldrich). La cantidad de ADNg presente en los extractos se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nM (A_{260}), antes de ser diluido a 5 ng/mL y conservado a - 20 °C hasta el momento de su uso.

La dosis génica de *EGFR* se determinó sobre 10 ng de ADNg mediante qPCR. Como control interno de dosis génica se utilizó el gen *GAPDH* (del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Las condiciones de las reacciones de qPCR fueron las descritas en el apartado para las qPCRs realizadas sobre ADNc y los cebadores específicos empleados en las mismas se detallan en la Tabla M4.

2.3 Análisis de la expresión proteica por western blot (WB)

2.3.1 Preparación de muestras para la extracción proteica

Para la extracción de proteína a partir de cultivos celulares se colectó un volumen mínimo de cultivo de un frasco F25. Las células fueron centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 min, lavadas en PBS 1X (pH 7,4) frío y centrifugadas de nuevo para conservarlas a -20 °C hasta el momento de la extracción proteica.

Para la obtención de proteína a partir de tejido tumoral, se realizó la disección del mismo en PBS 1X frío y los fragmentos de interés se conservaron a -80 °C hasta el momento de la extracción proteica.

2.3.2 Extracción y cuantificación de proteína

Las muestras fueron lisadas utilizando tampón RIPA (NaCl 150 mM, PB 20 mM, Tritón X-100 1 %, EDTA 5 mM y SDS 0,1 %) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche y PMSF 1 mM) y de fosfatasa (Na_3VO_4 1 mM y NaF 1 mM). Se añadió un volumen de 30 μL del tampón a cada pélet de células y un volumen que oscilaba entre 50 y 200 μL

en el caso de las muestras de tejido. Para la resuspensión de las muestras, se empleó una micropipeta en el caso de las células, subiendo y bajando el volumen 30 veces. En el caso del tejido, se utilizó el émbolo de una jeringa de 2 mL para disgregar el tejido, empleando seguidamente la micropipeta para la resuspensión absoluta del mismo. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 a 20 min para completar su lisado y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min y a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se conservó a - 20 °C hasta el momento de su uso.

La cuantificación de la cantidad de proteína total presente en los extractos de proteína se llevó a cabo mediante el método colorimétrico BCA de Pierce (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando diluciones seriadas de concentraciones conocidas de BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*) (Thermo) en un rango de 0 a 2 mg/mL como estándares para la cuantificación. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (TECAN Infinite M2000) a una longitud de onda de 562 nm (A_{562}).

2.3.3 Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia proteica a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE utilizando el sistema OmniPAGE mini (Durviz). La composición del gel separador fue: Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), APS 0,025 % (p/v) y TEMED 0,126 % (v/v) y porcentajes de acrilamida variables en un rango de 7,5 % a 12 % (p/v), en función del peso molecular de las proteínas que se fueran a detectar. El gel concentrador estaba compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, acrilamida-bisacrilamida 4 % (p/v), SDS 0,08 % (p/v), persulfato amónico 0,08 % (p/v) y TEMED 0,2 % (v/v). En cada pocillo del gel de acrilamida se cargó una cantidad de proteína total equivalente que oscilaba entre 15 y 50 µg en función de las proteínas que se quisieran inmunodetectar. Los extractos proteicos fueron diluidos en tampón RIPA (suplementado con inhibidores de proteinasas y fosfatasa) hasta alcanzar el mismo volumen en todas las muestras, al cual se añadió la cantidad adecuada de tampón de carga preparado al 5X (Tris-HCl 90 mM, glicerol 25 % (v/v), β-mercaptoetanol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,01 % (p/v)).

A continuación, las muestras fueron hervidas durante 5 min a 95 °C en un termobloque para lograr la desnaturalización de las proteínas y se cargaron en los geles de acrilamida. Se dejaron correr durante 15 min con un voltaje de 65 mV para la concentración de las muestras y, a continuación, se elevó el voltaje a 120 mV para la separación de las mismas (se mantuvo la corriente hasta que el frente de azul de bromofenol hubiese abandonado el gel). El tampón de electroforesis empleado en dicho proceso se componía de glicina 2 M, Tris base 250 mM y SDS 0,1 % (p/v). Se utilizó un marcador de peso molecular (MW, del inglés *molecular weight*) preteñido que cubría el rango de 10 a 250 kDa (Thermo).

Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Bioscience) en un tampón de transferencia compuesto por glicina 2 M, Tris base 250 mM y metanol 20 % (v/v), durante 4 h, con un voltaje constante de 80 mV y en el interior de la cámara fría para evitar un incremento excesivo de temperatura del sistema de transferencia.

2.3.4 Inmunodetección proteica y revelado

Una vez finalizada la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con rojo de Ponceau (Ponceau S 0,1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)) para comprobar la correcta transferencia proteica a las mismas y la equivalencia de proteína total en los distintos carriles cargados.

Las membranas se lavaron durante 10 min con tampón TBS (del inglés *tris-buffered saline*), compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,9 % (p/v) y suplementado con el detergente Tween-20 al 0,1 % (v/v) (TBS-T), para eliminar la tinción de rojo Ponceau y se bloquearon con leche 5 % (p/v) o con BSA 5 % (p/v) en TBS-T (en función del anticuerpo primario con el que se fuesen a incubar) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación de balanceo. A continuación, se incubaron con los distintos anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo durante toda la noche (o/n, del inglés *over night*) a 4 °C y en agitación de balanceo. Los anticuerpos primarios y diluciones empleados se hallan detallados en la Tabla M6.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 5 min de las membranas con TBS-T para eliminar los anticuerpos primarios sobrantes y se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla M7) diluidos en TBS-T, durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación de balanceo. Seguidamente, las membranas fueron lavadas con TBS-T dos veces durante 5 min, a temperatura ambiente y en agitación para eliminar los restos del anticuerpo secundario. Se realizó un último lavado de las membranas con TBS (sin Tween-20), para eliminar los restos de detergente. Las membranas se incubaron durante 5 min en oscuridad con el sustrato de quimioluminiscencia Immobilon™ Western (Millipore) y, a continuación, se colocaron en el interior de un cassette de revelado para realizar exposiciones sobre películas fotográficas de distinta duración (en el interior de la sala de revelado, con luz roja) y proceder al revelado de las mismas.

2.3.5 Desprendimiento de los anticuerpos primarios de las membranas

Las membranas fueron tratadas con una solución de NaOH 0,5 M cuando fue necesario el desprendimiento de los anticuerpos primarios y secundarios con los que se habían incubado previamente. Dicho tratamiento se realizó durante un periodo de tiempo que varió entre 1 y 5 min, en función de la señal obtenida con los anticuerpos con los que se había realizado la

inmunodetección previa. A continuación, se procedió a lavar las membranas con TBS-T durante 1 h, realizando cambios del tampón cada 10-15 min como paso previo al bloqueo de las membranas y posterior reincubación de las mismas con los anticuerpos primarios de interés.

2.3.6 Cuantificación de bandas por densitometría

Las imágenes obtenidas a partir de las exposiciones realizadas sobre películas fotográficas fueron digitalizadas para la cuantificación de la intensidad de la señal obtenida mediante el programa informático Image J. La densidad de las bandas de las distintas proteínas analizadas se normalizó utilizando la densidad de las bandas de Actina o GAPDH. En los experimentos de xenoinjertos de ratón tratados con dacomitinib los niveles de expresión proteica se representaron mediante “mapas de calor” utilizando el programa Excel, que asignó un color a cada valor de densidad media de cada experimento, siendo verde el color que representaba una menor expresión de la proteína, amarillo el que indicaba una expresión media y rojo el que correspondía la expresión máxima de la misma.

3 Ensayos *in vitro*

3.1 Reactivos

3.1.1 Clorhidrato de harmina (o harmina)

El inhibidor de la actividad quinasa de DYRK1A clorhidrato de harmina (TCI Europe) (Figura M2A) se disolvió en agua destilada estéril a una concentración de 25 mM para generar el stock del inhibidor que se conservó a -20 °C hasta su uso. En los ensayos *in vitro* el clorhidrato de harmina se utilizó a una concentración final de 20 μM. En el texto se hará referencia a este compuesto como clorhidrato de harmina o harmina indistintamente.

3.1.2 INDY

El inhibidor de la actividad quinasa de DYRK1A INDY, cuyo nombre químico es (1Z)-1-(3-Ethyl-5-hydroxy-2(3H)-benzothiazolylidene)-2-propanone (Figura M2B), fue cedido por el Dr. Masatoshi Hagiwara de la Universidad de Kyoto. El stock se hallaba disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración de 10 mM y se conservó a -20 °C hasta su uso. En los ensayos *in vitro* se empleó una concentración 20 μM de INDY y en los cultivos que se utilizaron paralelamente como controles se agregó la misma proporción de DMSO que en los tratados con el inhibidor.

3.1.3 Dacomitinib

El inhibidor de segunda generación de la actividad quinasa de EGFR dacomitinib (o PF299804, Pfizer) (Figura M2C) se disolvió en DMSO a una concentración de 20 mM para generar el stock que se conservó a -80 °C hasta su uso. Las concentraciones de uso de dacomitinib en los ensayos *in vitro* estaban comprendidas entre 0 y 200 nM, siendo necesaria la preparación de una dilución intermedia del inhibidor en MC-SUP a una concentración de 20 µM. En los cultivos que se utilizaron paralelamente como controles se agregó la misma proporción de DMSO que en los tratados con la mayor concentración de dacomitinib.

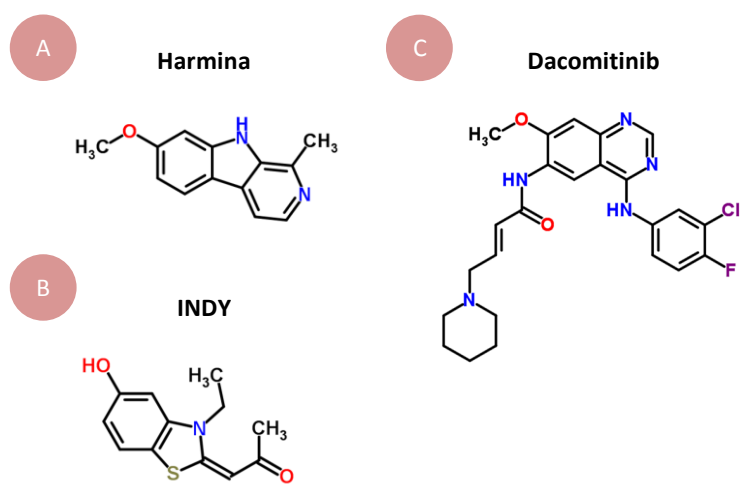


Figura M2. Estructura química de los inhibidores farmacológicos empleados en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En la figura se muestra la estructura química de los inhibidores de la actividad quinasa de DYRK1A (A) harmina e (B) INDY, así como la del inhibidor de la actividad quinasa de EGFR (C) dacomitinib.

3.2 Evaluación de los efectos de las drogas antitumorales

3.2.1 Determinación de la viabilidad celular (Figura M3A).

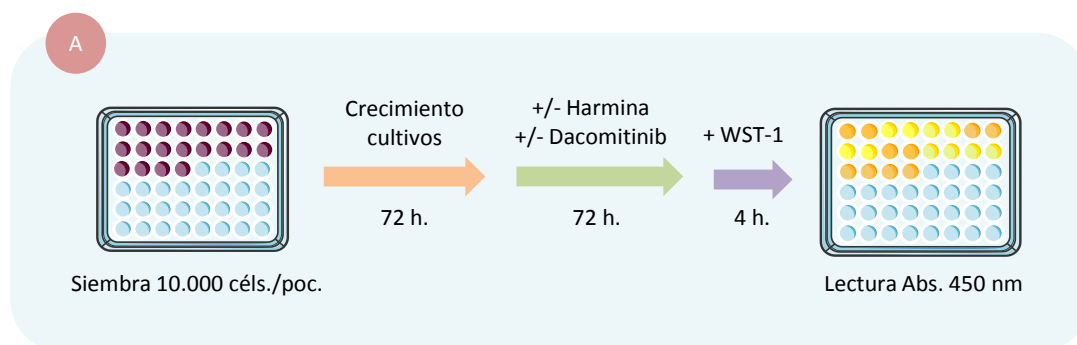
La viabilidad celular de los cultivos se determinó mediante el uso del reactivo WST-1 (Roche). Para ello, se sembraron 10.000 células en cada pocillo de placas multipocillo P96 a una densidad de 100 céls./µL. Se dejaron crecer en MC-SUP durante 72 h y, a continuación, se añadió al medio la droga cuyo efecto sobre la viabilidad celular se deseaba evaluar. Transcurridas 72 h en presencia de las drogas, se añadió 10 µL/pocillo de reactivo WST-1 (en oscuridad) y se protegió la placa inmediatamente de la luz. Seguidamente, se agitó la placa en un agitador orbital durante 1 min a 100 rpm y se incubó durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se procedió a la lectura de la reacción colorimétrica en un espectrofotómetro (TECAN Infinite M2000), midiendo la absorbancia a 450 nm y tomando como referencia la absorbancia a 600 nm. El análisis de los datos obtenidos se realizó considerando que el 100 % de viabilidad correspondía a la absorbancia de aquellas células control tratadas únicamente el disolvente de la droga testada.

3.2.2 Determinación de la capacidad de auto-renovación (Figura M3B).

Las células iniciadoras de tumores o células madre tumorales poseen la capacidad de auto-renovarse, es decir, de dividirse en numerosas ocasiones, manteniendo su estado indiferenciado y dando lugar a una progenie celular con las mismas características. Con el objetivo de determinar la cantidad de células del cultivo con dicha capacidad, las células recién disociadas se sembraron a una densidad clonal de 5 células/ μL en placas multipocillo P96 en un volumen total de MC-SUP de 200 μL /pocillo, para evitar la agregación de las mismas. A los 6 días se realizó un recuento de las esferas formadas como reflejo de la capacidad de autorenovación de las células sembradas y se determinó el porcentaje de células del cultivo con capacidad de autorrenovación en cada una de las condiciones experimentales evaluadas.

3.2.3 Determinación de la capacidad de proliferación (Figura M3C)

El porcentaje de células proliferantes en un cultivo se determinó mediante ensayos de incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich), un nucleótido sintético análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante su replicación, en la fase S del ciclo celular. Esta técnica proporciona una medida de la cantidad de células que se hallan en dicha fase en el momento en el que se realiza el pulso de BrdU. Para los ensayos de proliferación *in vitro* se añadió BrdU 2 μM al medio de cultivo y se incubaron las células durante 5 min a 37 °C. A continuación, las esferas se adhirieron a cubreobjetos de vidrio previamente tratados con una dilución 1:100 de Matrigel (Bekton-Dickinson) en medio DMEM, durante 10 min adicionales. Las células adheridas fueron fijadas con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) preparada en tampón fosfato (PB 0,1 M, del inglés *phosphate buffer*) durante 10 min, a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 min con PB 0,1 M en agitación orbital y se prosiguió con la detección de la BrdU incorporada mediante técnicas de inmunofluorescencia descritas a continuación.



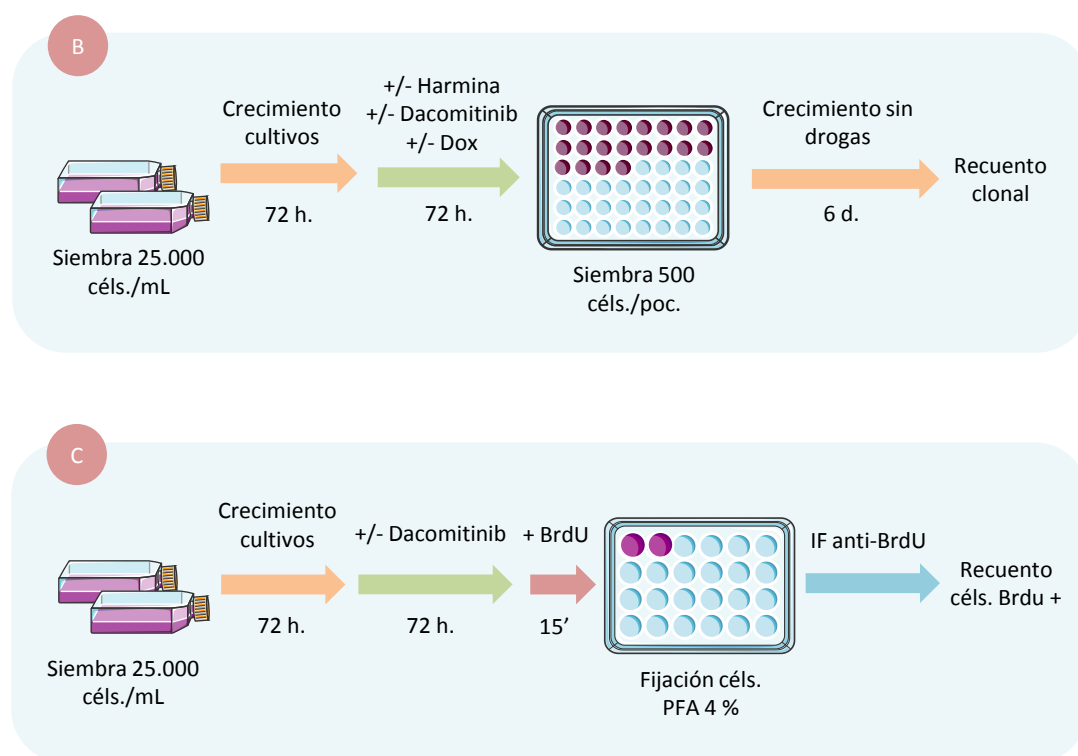


Figura M3. Ensayos *in vitro*. Resumen esquemático de las técnicas empleadas sobre los cultivos celulares para determinar el efecto de las drogas evaluadas sobre (A) la viabilidad celular, (B) la capacidad de autorenovación y (C) la proliferación de las TICs de GBM.

3.2.4 Técnicas inmunofluorescentes

Dado que los cultivos de TICs de GBM crecen en forma esferas en suspensión, fue necesario adherirlas sobre cubreobjetos como paso previo a la tinción de las mismas. Para ello, se utilizaron cubre-objetos de vidrio tratados con una solución de Matrigel (1:100 en DMEM) o/n, a 37 °C y posteriormente lavados con agua destilada estéril. Los cubres se guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso. La adhesión de las neuroesferas en cultivo se realizó mediante la adición de 500 µL de suspensión celular sobre los cubre-objetos tratados con matrigel y su incubación durante 10 min a 37 °C. Tras observar al microscopio que las células se habían adherido al sustrato, estas fueron fijadas durante 10 min con PFA 4 % y lavadas con PB 0,1 M tres veces durante 5 min. Seguidamente, se bloquearon las uniones inespecíficas mediante la incubación de las células con solución de bloqueo (PB 0,1 M, BSA 2 % (p/v, Sigma) y Triton-X-100 0,2 % (v/v, Sigma)) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación orbital a 65 rpm. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M6) diluido en solución de bloqueo o/n, a 4 °C y en agitación orbital continuada.

Para la inmunodetección del BrdU, las células fijadas fueron tratadas con HCl 2N (previamente atemperado a 37 °C) durante 15 min para lograr un desenmascaramiento antigénico adecuado. A continuación, la solución ácida fue neutralizada mediante la adición de una solución de borato sódico 0,1 M (pH 8,6) con la que se incubaron las muestras durante 10 min

y a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 5 min con PB 0,1 M y se procedió con el protocolo de inmunofluorescencia de manera análoga al resto de tinciones, bloqueando las muestras como paso previo a la incubación con el anticuerpo primario.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 min con PB 0,1 M y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla M7) diluido en solución de bloqueo, para ser incubado durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación orbital. Seguidamente, se efectuaron tres lavados de 5 min con PB 0,1 M y se tiñeron los núcleos con una solución a 2 µg/mL de DAPI (del inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*) (Sigma) en PB 0,1 M durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación orbital. Por último, se realizó un último lavado con PB 0,1 M y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con el medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotech). Las preparaciones se dejaron secar durante 12 h protegidas de la luz antes de ser conservadas a 4 °C hasta el momento de su observación y de la captura de imágenes en el microscopio confocal (Leica TCS SP5 AOBS). Los recuentos de las células que habían incorporado BrdU (células en proliferación) respecto al número total de células presentes se realizaron con ayuda del programa informático Leica AF.

3.3 Determinación de los niveles de EGFR, de su internalización y degradación

3.3.1 Medida de los niveles basales de EGFR en membrana por citometría de flujo (Figura M4A)

Las células tratadas durante 72h con harmina o con doxíciclina (GBM-DYRK1Ash) fueron disgregadas con Accumax y filtradas a través de filtros estériles de 30 µm (Partec) para eliminar los agregados celulares. A continuación, las células fueron centrifugadas 5 min a 3.000 rpm y, tras eliminar el sobrenadante, fueron resuspendidas en tampón de tinción (PBS-BSA 1 % (p/v)) para centrifugar de nuevo y eliminar los restos de medio de cultivo del sobrenadante. Seguidamente, las células resuspendidas en tampón de tinción se separaron en dos tubos: en el primero se incubaron en el propio tampón de tinción (control negativo) y en el segundo, con una dilución 1:5 (en tampón de tinción) del anticuerpo primario anti-EGFR conjugado con el fluoróforo FITC (del inglés *fluorescein isothiocyanate*) (Abcam), que reconoce específicamente el dominio EC del receptor. Las muestras se mantuvieron durante 30 min en hielo y protegidas de la luz antes de realizar un último lavado y ser resuspendidas en tampón de tinción para su análisis en el aparato FACSCalibur (Beckton Dickinson). Los datos obtenidos fueron procesados con ayuda del programa informático FlowJo, que permitió determinar el porcentaje de células con expresión de EGFR en membrana en cada una de las condiciones experimentales evaluadas.

3.3.2 Medida de los niveles de EGFR en membrana y de su internalización tras la estimulación con el ligando (Figura M4B)

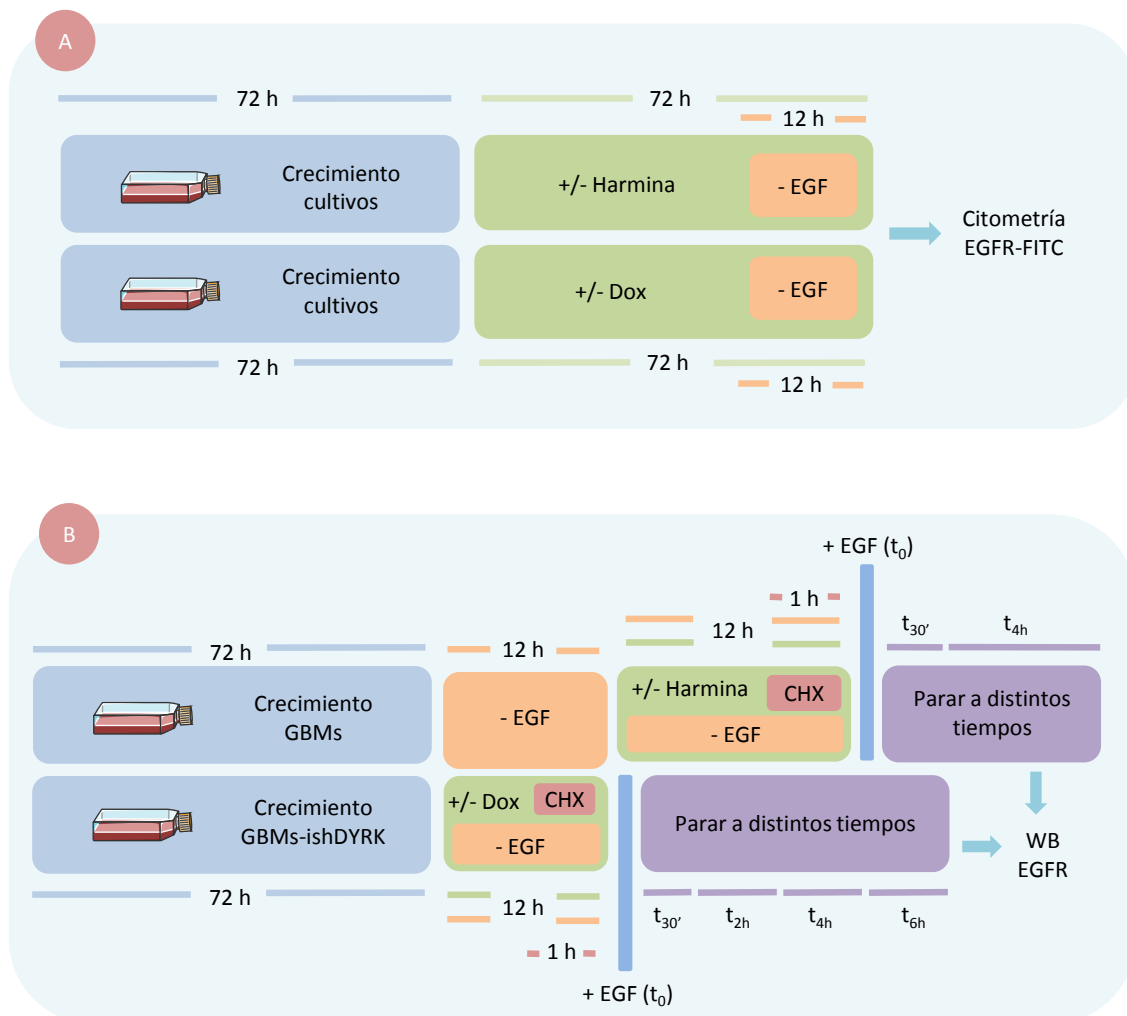
Las células a evaluar fueron sembradas en 12 frascos de 75 cm² a una densidad de 50.000 céls./mL y se dejaron crecer durante 72 h. Durante las 12 h previas a la realización del ensayo, las neurosféricas se cultivaron en ausencia de EGF. A continuación, se añadió harmina a una concentración final de 20 µM a 6 de los 12 frascos sembrados, que fueron incubados durante 5 h a 37 °C. Transcurridas 4 h de incubación, se adicionó cicloheximida (Sigma) a 30 µg/mL a todos los frascos (controles y tratados con el inhibidor) y se mantuvo en el medio durante 1 h. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en células eucariotas que actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S y bloquea, por tanto, la elongación traduccional. Transcurrido dicho tiempo, se realizaron pulsos de EGF a 100 ng/mL en todos los frascos y se colectaron las células en los siguientes puntos temporales: tiempo inicial (t_0), 30 min ($t_{30\text{min}}$) y 4 h (t_{4h}) después de la estimulación con el factor de crecimiento, teniendo células con y sin harmina en cada punto temporal (se emplearon 2 frascos para cada punto del ensayo). Las células colectadas se enfriaron inmediatamente en hielo, se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min, a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS 1X frío. Las muestras se conservaron a - 20 °C hasta su utilización para la extracción proteica y la realización de WB.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo con las células de GBM-DYRK1A^{sh} pero en este caso las células que llevaban 72 h en crecimiento se incubaron durante 12 h con doxiciclina y en ausencia de EGF. A continuación se siguieron los mismos pasos descritos previamente para los cultivos tratados con el inhibidor de la actividad quinasa de DYRK1A.

3.3.3 Medida de la degradación lisosomal de EGFR tras la estimulación con el ligando (Figura M4C)

Las células se sembraron a densidad de 50.000 céls./mL y se dejaron crecer durante 72 h. Durante las últimas 12 h, las neurosféricas fueron privadas de EGF en el medio de cultivo y transferidas a placas multipocillo P24 en las que se había colocado cubreobjetos de vidrio tratados con matrigel para favorecer la adhesión de las células y el análisis posterior de las muestras mediante técnicas de microscopía. Transcurrido este tiempo se añadió harmina a una concentración final de 20 µM a la mitad de los frascos y se dejó actuar durante 4 h, tras las que se añadió 100 ng/mL de EGF conjugado con el fluoróforo AlexaFluor488 (Invitrogen) y 50 nM de LysoTracker Red (Invitrogen) al medio de cultivo. Desde este momento, las células se mantuvieron siempre protegidas de la luz para evitar la pérdida de fluorescencia de los reactivos empleados. Seguidamente, las células se incubaron durante 30 min a 4 °C para favorecer la unión del EGF-AlexaFluor488 al receptor presente en la membrana de las células y evitar su internalización. A

continuación, se lavaron las células adheridas en los cubreobjetos con PBS 1X frío y se fijaron (t_0) o se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 15 min ($t_{15\text{min}}$), 30 min ($t_{30\text{min}}$) y 90 min ($t_{1h30\text{min}}$) para permitir la internalización del ligando fluorescente antes de fijarlas con PFA 4 % durante 10 min, a temperatura ambiente y en agitación orbital. Seguidamente, se lavaron 3 veces con PB 0,1 M durante 5 min y se tiñeron los núcleos con una solución a 2 µg/mL de DAPI. Tras un último lavado con PB 0,1 M, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje Fluoromount-G (Southern Biotech) y se dejaron secar durante 12 h antes de ser analizadas en un microscopio confocal (Leica TCS SP5 AOBS) en el que se tomaron fotografías que permitieron cuantificar los puntos amarillos de co-localización de la señal emitida por el EGF-AlexaFluor488 y el LysoTracker Red como reflejo de la cantidad de EGFR destinada a degradación lisosomal en las células. El análisis de las imágenes se realizó con ayuda del programa informático ImageJ.



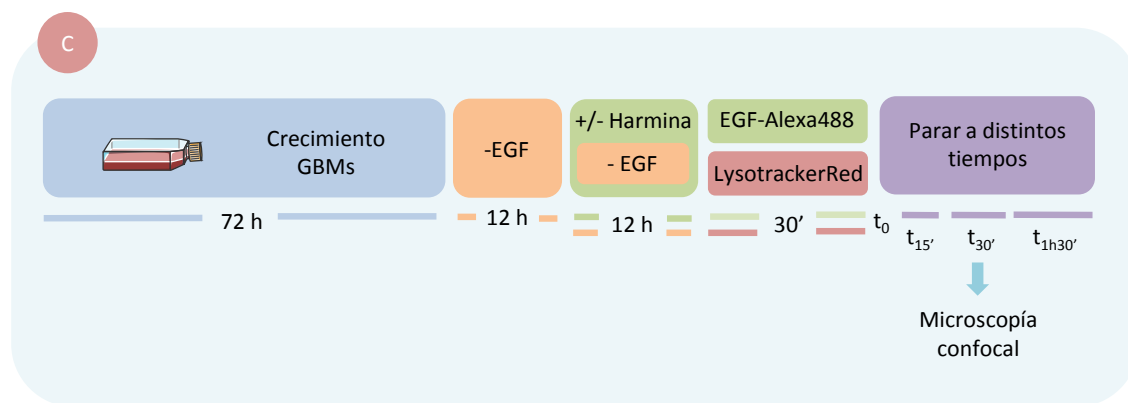


Figura M4. Esquema de los métodos utilizados para el análisis de la estabilidad de EGFR. La estabilidad de EGFR en relación con la expresión de DYRK1A y de su actividad quinasa se determinó mediante (A) ensayos de citometría de flujo para la detección de los niveles basales de receptor en membrana, (B) análisis de la cinética de degradación de EGFR tras la estimulación con EGF y (C) ensayos de co-localización de EGFR en lisosomas para determinar la cantidad de receptor degradado en dichos orgánulos.

4 Ensayos *in vivo*

4.1 Trasplantes de células tumorales a ratones inmunodeprimidos

Los trasplantes de de TICs de glioblastoma se realizaron en ratones inmunodeprimidos Nude Foxn1nu (Harlan Ibérica) de entre 2 y 3 meses de edad. Los animales utilizados en este trabajo de tesis se mantuvieron en las instalaciones del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) y permanecieron bajo control veterinario.

4.1.1 Anestesia, analgesia y reversión de la anestesia

Los ratones fueron anestesiados con una solución compuesta por ketamina 10 % (v/v, Imalgene 1000, Merial Laboratorios) y xilacina 9,3 % (v/v, Xilagesic, Carier) en PBS 1X estéril. La dosis administrada por vía intraperitoneal fue de 200 μ L de solución anestésica por cada 25 g de peso del animal. Tras ser anestesiados, se les administró por vía subcutánea (100 μ L por cada 25 g de peso del animal) una solución analgésica compuesta por meloxicam 10 % (v/v, Metacam, Boheringer-Ingelheim) en PBS 1X estéril. Tras la cirugía, los ratones se despertaron mediante la inyección intraperitoneal (100 mL por cada 25 g de peso del animal) de una solución compuesta por un antagonista alfa-2 adrenérgico al 7,7 % (v/v, Antisedan, Esteve) en PBS 1X estéril. Los animales se mantuvieron en una manta termorreguladora (Cibertec) a 37 °C hasta que recuperaron la consciencia, momento en el que fueron estabulados de nuevo.

4.1.2 Trasplantes subcutáneos (Figura M5A)

Las esferas de TICs de GBM que llevaban 5 días creciendo en cultivo fueron disgregadas siguiendo el protocolo de pase celular descrito previamente y se determinó el número de células viables utilizando azul de tripano. Un número variable de $1,5 \cdot 10^6$ a $3 \cdot 10^6$ células (en función de la línea celular) fue inyectado en cada uno de los flancos de ratones Nude. Las células fueron

resuspendidas en MC-SUP al que se añadió matrigel (1:1) y se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la inyección. Los animales fueron anestesiados, tal y como se ha descrito con anterioridad, y se les inyectó la suspensión celular utilizando jeringas y con ayuda de unas pinzas para levantar la piel y facilitar entrada de la aguja y la liberación de las células en el espacio subcutáneo. Después de la inoculación, se mantuvo la aguja en el lugar de la inyección durante 10 s antes de ser retirada, evitando el reflujo de la suspensión celular para garantizar que en cada flanco se había inyectado la misma cantidad de células. Tras la reversión de la anestesia, se observó que todos los animales se habían recuperado adecuadamente antes de ser estabulados de nuevo. Los animales fueron observados de manera periódica para detectar la aparición de tumores en los flancos que fueran macroscópicamente visibles e iniciar entonces el tratamiento farmacológico de los mismos.

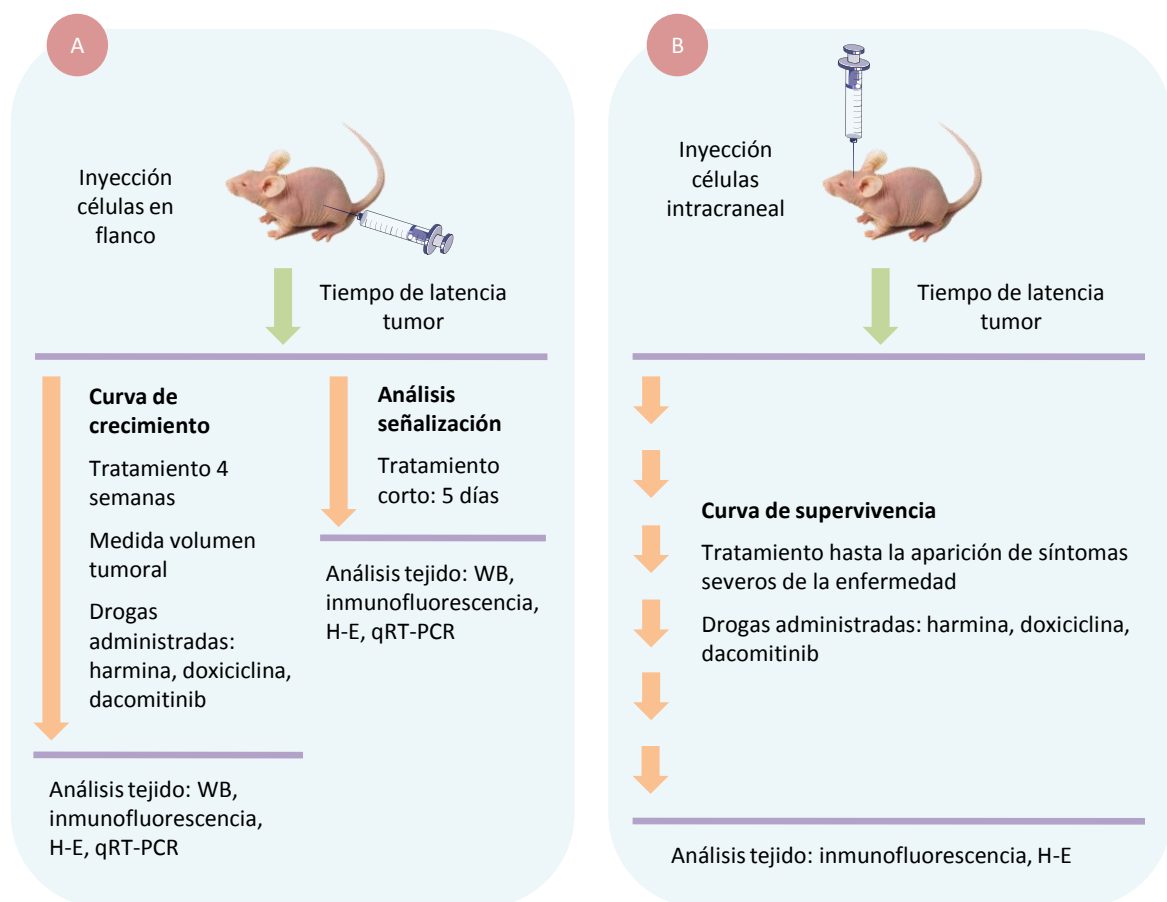


Figura M5. Esquema de los métodos empleados en los ensayos *in vivo*. Resumen de las técnicas empleadas para la realización de los trasplantes de TICs de GBM a ratones Nude, tanto (A) subcutáneos como (B) intracraneales y el análisis de los tejidos obtenidos.

4.1.3 Trasplantes intracraneales (Figura M5B)

Las esferas de los cultivos de TICs de GBM fueron disgregadas, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y resuspendidas en MC-SUP a una densidad de 25.000 células/ μ L. Se

inyectó un volumen total de 2 μ L de dicha suspensión celular (50.000 células) en el estriado de cada animal, por tratarse de la región más quiescente del cerebro adulto. Las cirugías se realizaron con ayuda de un aparato estereotáctico (MyNeurolab, Benchmark) en el que se colocaron los animales tras ser anestesiados. Una vez inmovilizados, se procedió a la apertura de una incisión en la piel del cráneo de aproximadamente 1,5 cm en dirección rostro-caudal, se limpió la herida con ayuda de un bastoncillo de algodón y se humedeció la misma con NaCl 0,9 % (p/v) estéril (Braun). A continuación, se fijaron las coordenadas para la inyección intracraneal de la suspensión celular (2 mm medial-lateral y -0,5 mm rostral, tomando Bregma como referencia) y se perforó el cráneo con ayuda de un taladro (Grobet) para permitir la entrada de la jeringa Hamilton de 2 μ L de capacidad. Las células se inyectaron a una profundidad de 3 mm ventral desde la superficie de la corteza y se esperó un minuto antes de comenzar a retirar la aguja. Esta se retiró de mm en mm, esperando un minuto de reposo previo a cada elevación para evitar el reflujo de la suspensión celular inyectada. Una vez retirada la jeringa, se procedió al sellado de la piel del cráneo empleando el pegamento tisular Histoacryl (B-Braun). Tras la reversión de la anestesia y la comprobación de que habían recuperado la consciencia y la movilidad, los animales fueron estabulados de nuevo y observados periódicamente para la detección de los síntomas característicos del desarrollo de la enfermedad: pérdida de peso, lordosis y alteraciones motrices.

4.2 Tratamientos farmacológicos

4.2.1 Tratamiento con dacomitinib

El inhibidor dacomitinib (PF-00299804, Pfizer) se disolvió en lactato sódico 20 mM, pH 4 (Sigma) a una concentración de 1,5 mg/mL y se conservó a 4 °C y protegido de la luz durante su uso, siendo preparado semanalmente para conservar su actividad farmacológica óptima. Para su completa disolución en lactato sódico, la suspensión de dacomitinib se atemperó a 37 °C y se agitó con ayuda de un vórtex hasta que los precipitados desaparecieron completamente. La administración de dacomitinib a los ratones se realizó por vía oral mediante el uso de sondas intragástricas de 18 G de diámetro y 5,088 mm de longitud (Fine Science Tools). La dosis de dacomitinib que se administró diariamente fue de 15 mg por Kg de animal, siguiendo una pauta de tratamiento de 5 días consecutivos seguidos por dos días de descanso. A los animales control (no tratados con dacomitinib) se les administró la dosis correspondiente a su peso de lactato sódico.

4.2.2 Tratamiento con harmina

El inhibidor se disolvió en solución salina (NaCl 0,9 %) a una concentración de 30 mg/mL y se conservó a 4 °C y protegido de la luz durante su uso. Para su preparación, se atemperó la suspensión a 37 °C y se incubó en un baño de ultrasonidos hasta su completa disolución. La

administración de harmina a los ratones se realizó por vía parenteral mediante la inyección intraperitoneal de la solución. La dosis que se administró diariamente fue de 15 mg de harmina por Kg de animal, siguiendo una pauta de 5 días consecutivos de tratamiento seguidos por dos días de descanso. Los animales control (no tratados con harmina) recibieron la dosis correspondiente a su peso de solución salina.

4.2.3 Tratamiento con doxiciclina

A los animales transplantados con células GBM-*DYRK1A*^{sh} se les administró doxiciclina en el agua de bebida para permitir la expresión del ARNsh codificado bajo el promotor inducible por doxiciclina y reducir la expresión de *DYRK1A* en las células tumorales. El antibiótico doxiciclina (Sigma) se disolvió en agua autoclavada a una concentración de uso de 2 mg/mL y se administró a los ratones como agua de bebida (grupo de animales “Dox”), la cual fue renovada cada 72 h y protegida de la luz durante su administración. Paralelamente, al grupo de animales control no se le proporcionó dicho antibiótico.

4.3 Obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

Las imágenes de resonancia magnética fueron adquiridas en el equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker) de 4.7 Teslas del CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid, equipado con un sistema de gradientes de 6 cm de diámetro interior capaz de alcanzar un gradiente máximo de 450 mT/m.

4.3.1 Administración de contraste y anestesia

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de oxígeno e isoflurano al 2% (p/p) y se les inyectó intraperitonealmente 0,1 mL de Gd-DOTA (Dotarem, Guerbet) como contraste para la RMN. A continuación, fueron colocados en posición prono en el interior de una sonda de volumen de radiofrecuencia de 3,5 cm de diámetro interior (Bruker, Alemania).

4.3.2 Adquisición de imágenes de RMN

En primer lugar, se realizaron imágenes de localización con orientaciones axial y sagital. Para ello se empleó una secuencia de eco de espín rápido con un tiempo de repetición (TR) de 2,1 s y un tiempo de eco (TE) efectivo de 62 ms. El *field of view* (FOV) fue de 3,0 x 3,0 cm² y la anchura de los cortes de 2,0 mm. El tamaño de la matriz adquirida fue de 256 x 128, por lo que el tiempo total de adquisición de cada experimento fue de 33 s. Los datos adquiridos fueron reconstruidos mediante un llenado con ceros (*zero filling*) en la dirección de la fase para dar imágenes de 256 x 256 píxeles.

Posteriormente, se adquirió una serie de imágenes coronales empleando una secuencia de eco de espín potenciada en T1 para la visualización y cuantificación del tumor. Los parámetros de

estas imágenes fueron: TR/TE = 505/10 ms; FOV = 2,56 x 2.56 cm²; anchura del corte = 1,0 mm; Número de promedios = 4. La matriz adquirida fue de 256 x 192 puntos. Mediante el llenado con ceros en la dirección de la fase se reconstruyeron imágenes de 256 x 256 píxeles. Antes de la adquisición se realizó una supresión de la señal de la grasa mediante un pulso de saturación de 90° sobre la señal de la misma.

4.4 Procesamiento histológico del tejido

4.4.1 Preparación de las muestras para su procesamiento histológico

4.4.1.1. *Tejido procedente de xenoinjertos intracraneales*

Los animales fueron anestesiados con isoflurano 100 % (p/p) (Isobavet, Schering-Plough) y, a continuación, fueron perfundidos intracardiamente con 20 mL de solución salina (0,9 % NaCl) para eliminar la sangre de la circulación sanguínea del animal y con 40 mL de PFA 4 % (p/v), haciendo pasar las soluciones lentamente para permitir la correcta fijación de los tejidos. Seguidamente, se procedió a la extracción del cerebro del animal y a su postfijación en PFA 4 % o/n, a 4 °C y en agitación orbital. Transcurrido dicho periodo, el tejido fue lavado dos veces con PB 0,1 M para eliminar los restos de solución fijadora.

4.4.1.2. *Tejido procedente de xenoinjertos subcutáneos*

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y, a continuación, se procedió a la extracción de los tumores subcutáneos que habían desarrollado con ayuda de material de cirugía previamente esterilizado en etanol al 70 % (v/v). Una vez extraídos, los tumores fueron fijados con PFA 4 % o/n, a 4 °C y lavados posteriormente con PB 0,1 M.

En ambos casos el tejido se conservó a 4 °C en PB 0,1 M con 0,05 % (p/v) de azida sódica (Sigma) hasta el momento de su procesamiento para evitar su contaminación.

4.4.1.3. *Procesado del tejido con criostato*

El tejido fue crioprotegido por inmersión en solución de sacarosa al 30 % (p/v) o/n, a 4 °C. A continuación, el tejido fue incluido en O.C.T. Compound (Tissue-Tek) y se congeló a - 20 °C para ser cortado en secciones seriadas de 10 a 30 µM de grosor con un criostato Leica VT 1000S (Leica Microsystems). En particular, los cerebros procedentes de los trasplantes intracraneales se cortaron en secciones coronales. Los cortes se recogieron sobre portaobjetos previamente tratados con una solución de gelatina-alumbre de cromo (gelatina 0,5 % (p/v), alumbre de cromo 0,2 % (p/v) y azida sódica 1 % (p/v)) para su correcta adhesión y se conservaron a - 20 °C hasta su uso para la realización de tinciones inmunofluorescentes.

4.4.1.4. *Procesado del tejido con micrótopo*

El tejido fue incluido en parafina mediante el uso del procesador Leica TP1020 (Leica

Microsystems). A continuación, se realizaron cortes de 10 μ M del tejido en un microtomo Leica RM2135 (Leica Microsystems) que fueron recogidos en portaobjetos gelatinizados. Se hicieron series de once portaobjetos, utilizando unos de ellos para la tinción de hematoxilina-eosina (H-E).

4.4.2 Tinciones inmunofluorescentes

Los cortes de tejido realizados con el criostato y adheridos sobre portas gelatinizados, se atemperaron a temperatura ambiente durante 30 min como paso previo a la tinción de los mismos. Seguidamente, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo compuesta por BSA al 2 % (p/v) y Triton X-100 al 0,2 % (v/v) en PB 0,1 M durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo (Tabla M6) o/n, a 4 °C y cubiertos con Parafilm en una cámara húmeda para evitar que los cortes se pudiesen secar. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 5 min con PB 0,1 M de los cortes y se incubaron las muestras con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla M7), diluido en solución de bloqueo. Al tratarse de anticuerpos secundarios conjugados con un determinado fluoróforo, la incubación se realizó en oscuridad durante 1 h y a temperatura ambiente. Seguidamente, los cortes se lavaron con PB 0,1 M tres veces durante 5 min y se realizó la tinción nuclear con una solución de DAPI a 2 μ g/mL en PB 0,1 M, durante 5 minutos en oscuridad. Tras un último lavado de los cortes con PB 0,1 M, se procedió al montaje de los mismos con el medio Fluoromount-G (Southern Biotech) y los cubreobjetos de vidrio de 24 x 60 mm (Lan Optics). Las muestras se mantuvieron durante 12 h a temperatura ambiente y preservadas de la luz, antes de conservarlas a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su observación al microscopio.

4.4.3 Microscopía de fluorescencia y confocal

Las muestras teñidas mediante técnicas de inmunofluorecencia fueron observadas inicialmente en el microscopio directo de fluorescencia Nikon E600 para comprobar la presencia de señal fluorescente y realizar los recuentos de células mitóticas y apoptóticas. La captura de imágenes en dicho microscopio se realizó con la cámara Nikon DM 1200. Algunas de las muestras se analizaron adicionalmente con el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 AOBS. La obtención de las imágenes se realizó mediante el uso del láser de argón (emisión a 499 nm) para excitar el fluorocromo 488, el de helio-neón (emisión a 543 nm) para la excitación del fluorocromo Cy3 y el diodo azul (emisión a 405 nm) para la detección de la tinción nuclear con DAPI. En las muestras que coexistían varios fluorocromos, estos fueron excitados de forma secuencial para evitar la interferencia entre canales de emisión y absorción. Las imágenes obtenidas se analizaron con ayuda de los programas Leica AF Lite, ImageJ y a Adobe Photoshop.

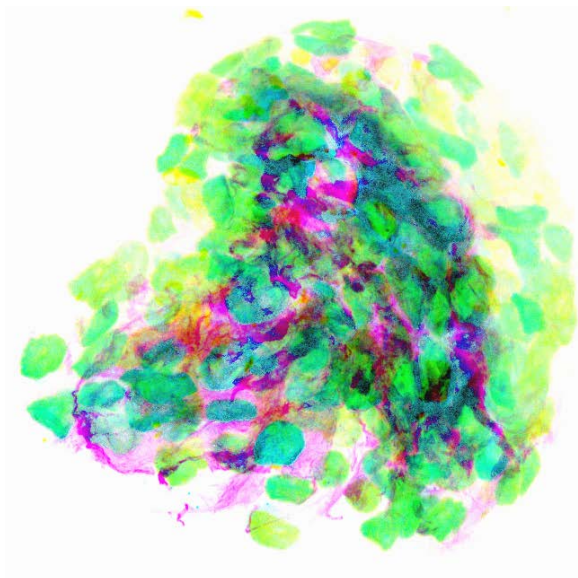
5 Análisis estadístico

Los ensayos *in vitro* se realizaron los experimentos en al menos tres cultivos independientes de cada una de las líneas primarias de TICS GBM ($n = 3$) y en los ensayos *in vivo* se empleó un número mínimo de 3 animales para cada condición experimental ($n = 3$).

Se determinó si la distribución de los datos a analizar era normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1995) y se aplicó el Test de Levene para evaluar la homogeneidad de varianzas. A continuación, se aplicó la prueba *t* de Student para la determinación de la significancia de las diferencias entre las condiciones control y experimentales. Las comparaciones entre valores relativos se realizaron empleando la transformación arcsen (raíz (valor)) antes de aplicar el test de la *t* (Sokal y Rohlf, 1995). Las curvas de supervivencia realizadas en ratones Nude fueron analizadas por el método de Kaplan-Meier y comparadas mediante el test de Log-Rank (Mantel 1966).

Los datos en los gráficos aparecen representados como las medias y el error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*). En todos los análisis realizados se ha considerado como significativa un valor de $p < 0,05$. Las probabilidades se han representado como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

- Todos los reactivos utilizados en este trabajo y descritos en este apartado están recogidos en la Tabla M1.



RESULTADOS

1. Caracterización de las líneas celulares de TICs de GBM

Para la realización de los ensayos *in vitro* e *in vivo* se utilizaron 7 líneas primarias de GBM capaces de generar tumores al ser inyectadas en ratones Nude (Figura R1), por lo que serán denominadas TICs de GBM.

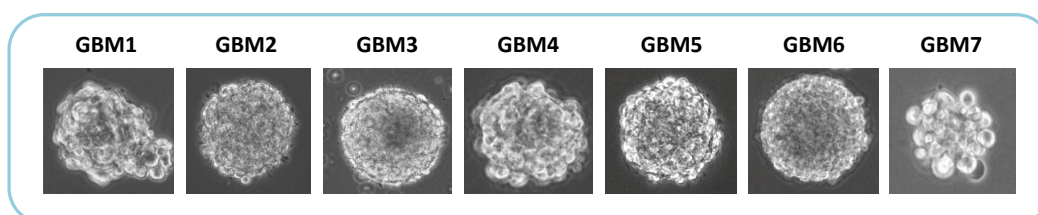


Figura R1. Cultivos celulares primarios de TICs de GBM. Imágenes representativas de microscopía óptica de los cultivos primarios utilizados para los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las células se cultivaron en medio libre de suero y en presencia de EGF y bFGF, originando los agregados celulares que se observan en las imágenes y que se denominan neurosféricas.

En primer lugar, se determinó la presencia de alteraciones en *EGFR*: amplificación génica y variable mutante *EGFRvIII*. La determinación de la dosis génica de *EGFR* se realizó mediante qPCR sobre el ADNg de las líneas, hallando que GBM1, GBM2, GBM3, GBM5 y GBM6 eran portadoras de la amplificación de *EGFR*, mientras que GBM4 y GBM7 no la presentaban. La forma mutante *EGFRvIII* se detectó mediante qRT-PCR sobre el ADNc de las líneas, siendo positivas GBM2 y GBM3. El porcentaje de células con expresión de EGFR en membrana (EGFR+) de cada cultivo se determinó mediante citometría de flujo. La ausencia de expresión de PTEN y la presencia de formas mutantes de P53 (más estables que la forma de tipo salvaje) se detectó mediante WB a partir de extractos proteicos de los cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Línea celular	Código paciente	Origen	<i>EGFR</i> amp	<i>EGFRvIII</i>	EGFR + (%)	Deleción <i>PTEN</i>	Mutación <i>P53</i>
GBM1	L0627	Mazzoleni et al.	1	0	41,7 ± 2,2	0	1
GBM2	12O-01	12 de Octubre	1	1	27,9 ± 4,0	0	0
GBM3	12O-12	12 de Octubre	1	1	82,9 ± 7,6	0	0
GBM4	12O-15	12 de Octubre	0	0	14,5 ± 1,9	0	1
GBM5	L0605	Mazzoleni et al.	1	0	55,2 ± 1,2	1	0
GBM6	L0306	Mazzoleni et al.	1	0	64,8 ± 2,6	0	0
GBM7	12O-02	12 de Octubre	0	0	3,8 ± 2,3	1	1

Tabla R1. Caracterización molecular de las líneas celulares de TICs de GBM. En la tabla se muestran los resultados del análisis genético y de expresión de los cultivos empleados para los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los valores 0/1 indican la ausencia/presencia de la mutación.

2. Efecto del inhibidor de EGFR dacomitinib en el comportamiento de las TICs de GBM

2.1 Dacomitinib disminuye la viabilidad de las TICs de GBMs *in vitro*

La determinación de las concentraciones de dacomitinib más adecuadas para la realización de los distintos ensayos *in vitro* sobre los cultivos de TICs de GBM se efectuó mediante ensayos de viabilidad en ausencia o presencia de distintas dosis (de 0 a 200 nM) del inhibidor de EGFR. Para ello, se añadió dacomitinib o DMSO (control) a los cultivos y tras 72 h de incubación se determinó la viabilidad celular de los mismos mediante un ensayo colorimétrico con el reactivo WST-1. Como muestra la Figura R2 en todas las líneas se alcanzaba una inhibición máxima de la viabilidad con una dosis de aproximadamente 50 nM (Figura R2), por lo que se decidió utilizar dacomitinib a 25 y 50 nM en los consiguientes ensayos *in vitro*.

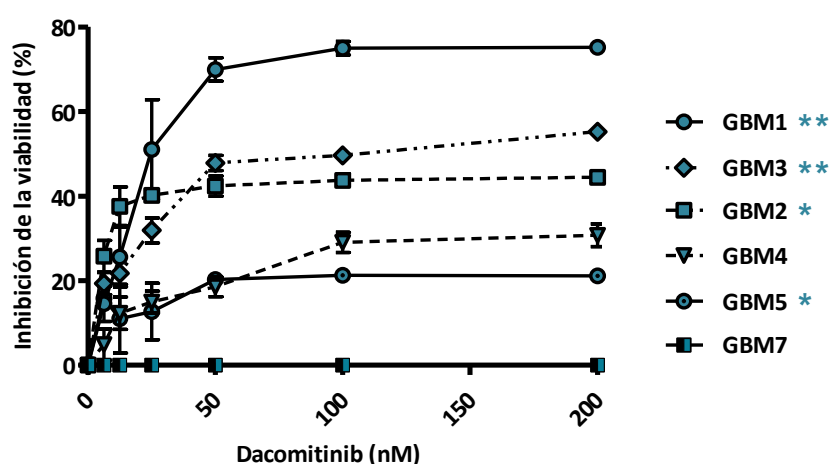


Figura R2. Dacomitinib disminuye la viabilidad de las TICs de GBM dependientes de EGFR. Curvas de viabilidad de las distintas TICs de GBM tras la incubación durante 72 h con distintas dosis de dacomitinib. Las líneas con amplificación de *EGFR* se indican con un asterisco a la derecha de su nombre, aquellas que adicionalmente presentan la forma mutante *EGFRvIII* se indican con dos asteriscos.

Asimismo, se observó que en el caso de la línea GBM4, la única sin amplificación de *EGFR*, el efecto de dacomitinib sobre la viabilidad era muy limitado (aproximadamente del 20 %) y nulo sobre la línea GBM7 (con una expresión muy reducida de EGFR en membrana), sugiriendo un efecto específico de la droga sobre las líneas dependientes del receptor. Además, se comprobó que el efecto de dacomitinib era independiente de la presencia de la forma mutante *EGFRvIII*.

2.2 Dacomitinib disminuye la capacidad de autorrenovación y de proliferación de las TICs de GBM con amplificación de *EGFR* *in vitro*

Con la finalidad de determinar si la inhibición de EGFR por dacomitinib era capaz de disminuir la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM, los cultivos se incubaron durante 72 h en presencia o ausencia de dacomitinib y a continuación se disgregaron las esferas y se sembraron a densidad clonal y en ausencia de la droga en el medio. El recuento de esferas

secundarias indicó que el inhibidor de EGFR afecta a la autorrenovación de las líneas con amplificación de *EGFR* pero no a la línea GBM4, que no presenta amplificación génica del receptor y expresa niveles bajos del mismo en la membrana celular, ni a la línea GBM7 (sin apenas expresión de EGFR en membrana) (Figura R3A). De acuerdo con lo anterior, se observó que dacomitinib producía una disminución significativa de la proliferación (porcentaje de células con incorporación de BrdU) tras 72 h de incubación en presencia de la droga, pero solamente en aquellos cultivos con amplificación de *EGFR*, sin efectos sobre las líneas GBM4 y GBM7 (Figura R3B).

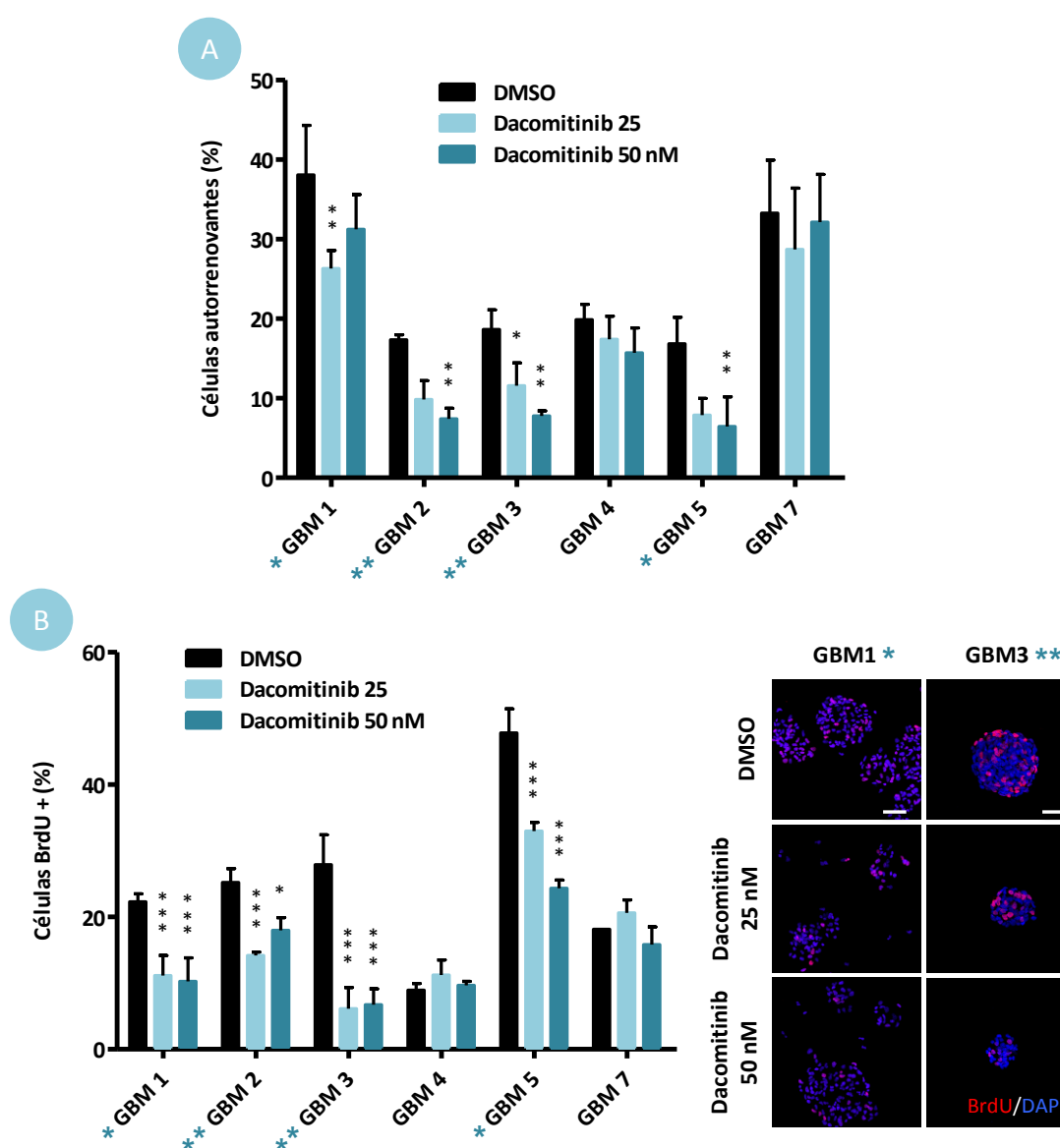


Figura R3. Dacomitinib disminuye la autorrenovación y la proliferación las TICs de GBM dependientes de EGFR *in vitro*. (A) Recuento de las esferas secundarias formadas tras la incubación de los cultivos durante 72 h en presencia o ausencia de dacomitinib. (B) Porcentaje de células BrdU-positivas en los cultivos control y tratados con dacomitinib durante 72 h. En la parte derecha, imágenes representativas de confocal de las inmunofluorescencias para la detección de las células con incorporación de BrdU (en rojo). Barra de escala: 50 μ M. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

2.3 Dacomitinib disminuye la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM con amplificación de *EGFR* *in vivo*

Para determinar si el efecto de dacomitinib sobre las TICs de GBM observado *in vitro* se traducía en la reducción del crecimiento tumoral *in vivo*, se inyectaron subcutáneamente de $1,5$ a $3 \cdot 10^6$ células en los flancos de ratones Nude. Cuando los tumores fueron visibles y de un tamaño mínimo adecuado, los ratones se separaron en dos grupos: el tratado con dacomitinib (15 mg/Kg/día) y el control, al que se administró dosis equivalentes de lactato sódico por la misma vía (intragástrica). El tratamiento de los ratones se mantuvo durante 4 semanas (5 días consecutivos por semana seguidos de 2 días de descanso) y se realizó un seguimiento del crecimiento de los tumores midiendo su volumen cada 4 o 5 días hasta que los animales fueron sacrificados. Las curvas de crecimiento de los tumores indicaron que el tratamiento con dacomitinib redujo el crecimiento tumoral en aquellas líneas de TICs de GBM con amplificación de *EGFR* pero no afectó al crecimiento de la línea con *EGFR* salvaje GBM4 (Figura R4).

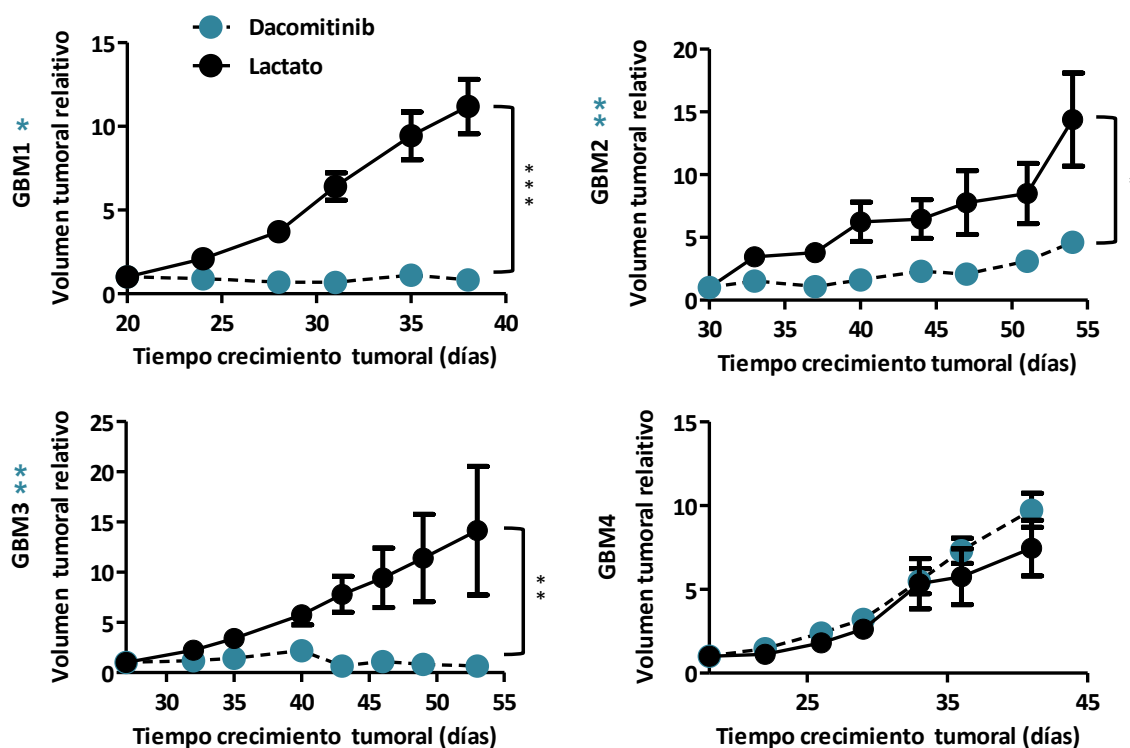


Figura R4. Dacomitinib inhibe el crecimiento tumoral de las TICs de GBM con *EGFR* amplificado *in vivo*.

Tras la inyección subcutánea de $1,5$ a $3 \cdot 10^6$ células de GBM en los flancos de ratones Nude, se esperó a que los tumores generados fueran visibles y de un tamaño adecuado para iniciar el tratamiento por vía oral con dacomitinib (15 mg/Kg/día) o con lactato (grupo control). El volumen tumoral fue medido cada 4-5 días. Los gráficos representan el incremento de volumen tumoral relativo al volumen tumoral inicial (en el momento del comienzo del tratamiento) durante el tiempo de duración del tratamiento. * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$.

En el punto final del experimento se observó una clara reducción del tamaño de los tumores tratados con dacomitinib respecto al de los controles en todas las líneas con *EGFR* amplificado (Figura R5).

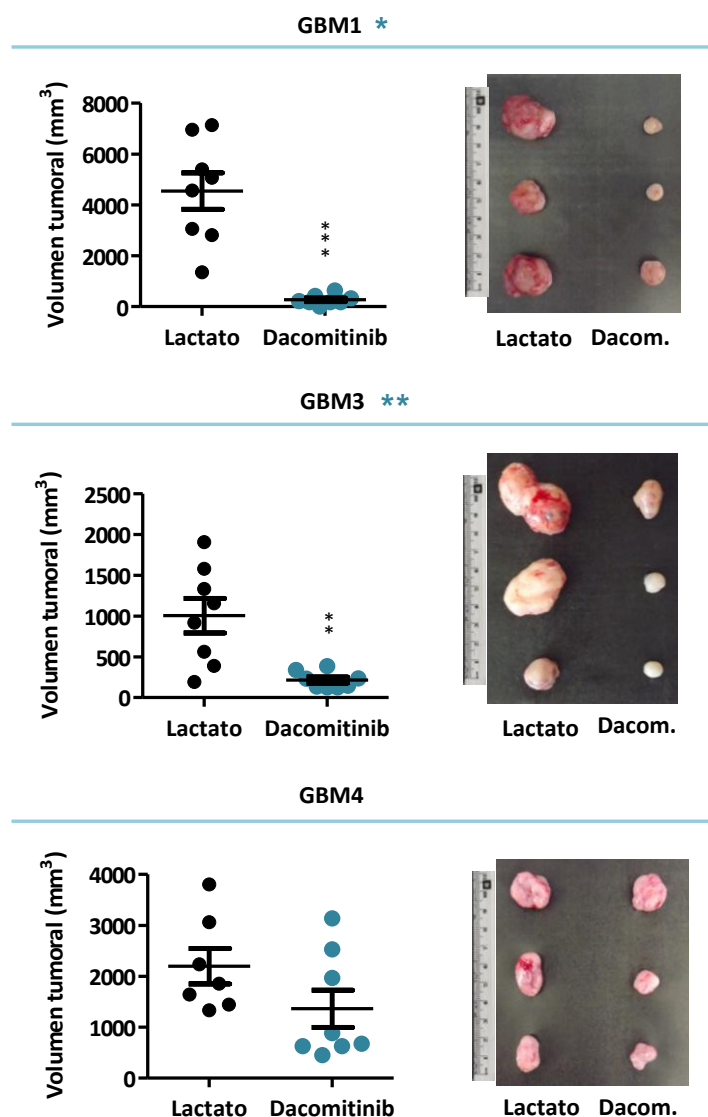


Figura R5. Los tumores subcutáneos generados por las TICs de GBM tratados con dacomitinib son de menor tamaño que los controles en aquellas líneas dependientes de *EGFR*. En la izquierda, los gráficos representan el volumen tumoral al finalizar el tiempo de tratamiento. En la derecha, imágenes macroscópicas de algunos de los tumores subcutáneos generados por las líneas GBM1, GBM3 y GBM4 a tiempo final del tratamiento con lactato o dacomitinib. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

El análisis del tejido tumoral mediante técnicas de inmunofluorescencia mostró una reducción significativa en el número de células proliferativas (mitosis por campo, Figura R6A) y un claro incremento de las regiones apoptóticas con presencia de células positivas para la tinción de Caspasa-3 activada (Figura R6B) en aquellas líneas en las que se había observado un efecto sobre el crecimiento tumoral tras el tratamiento con dacomitinib.

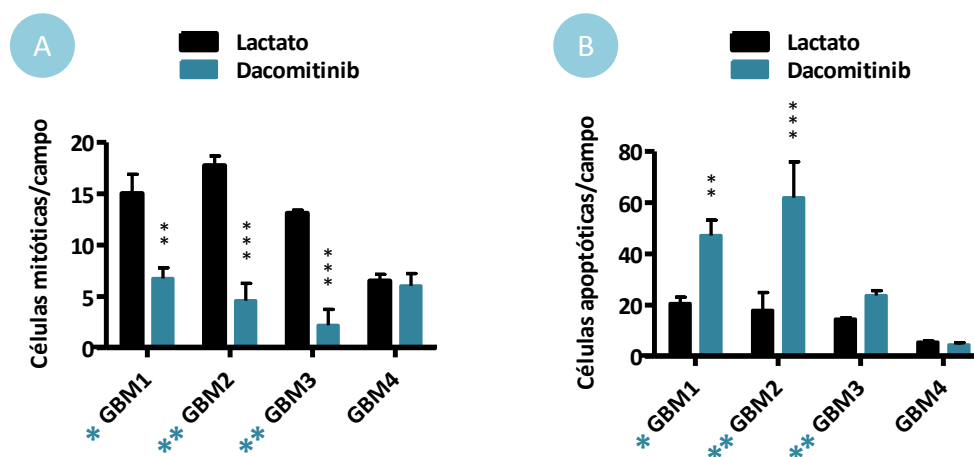


Figura R6. El tratamiento con dacomitinib reduce la proliferación e incrementa la apoptosis de las TICs de GBM dependientes de EGFR *in vivo*. (A) Número de células mitóticas por campo en el tejido de los tumores subcutáneos tratados con lactato y con dacomitinib. (B) Número de células positivas para la tinción de Caspasa-3 activada por campo en el tejido de los tumores subcutáneos tratados con lactato y con dacomitinib. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

2.4 El efecto de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral *in vivo* se revierte al interrumpir el tratamiento

Tras observar el efecto de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral *in vivo* de las distintas líneas de TICs de GBM, se quiso esclarecer si dicho bloqueo de la proliferación era irreversible. Para ello, se siguió el procedimiento descrito previamente para generar tumores subcutáneos de las líneas GBM1 y GBM3 y transcurrido el tiempo de tratamiento con dacomitinib se interrumpió la administración de la droga y se mantuvo el seguimiento del crecimiento tumoral realizando medidas cada 4-5 días. Las curvas de crecimiento obtenidas mostraron un rápido crecimiento de los tumores al retirar el tratamiento con dacomitinib (Figura R7), sugiriendo que la fracción de células que había sobrevivido al inhibidor de EGFR no había experimentado un efecto irreversible y era capaz de reestablecer el crecimiento de la masa tumoral de manera exponencial. Además, este experimento confirma el efecto específico de dacomitinib inhibiendo el crecimiento tumoral.

Así pues, estos resultados indicaron que el tratamiento con dacomitinib reduce la proliferación y la supervivencia de las TICs de GBM disminuyendo la carga tumoral, aunque sería necesario un tratamiento ininterrumpido para evitar la recidiva tumoral tras la administración de la droga.

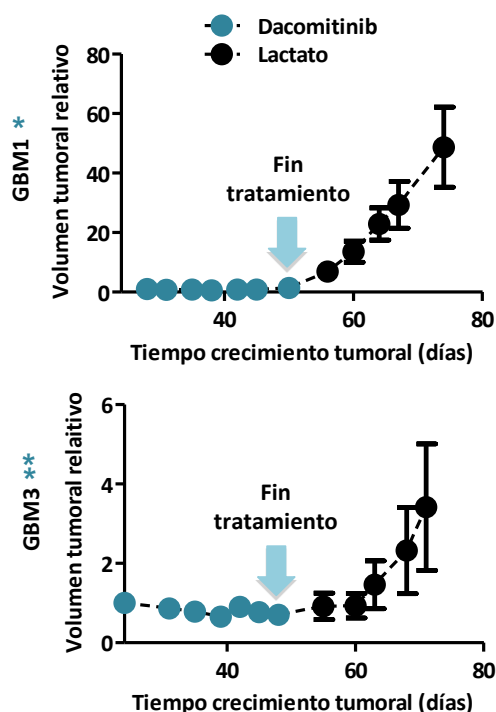


Figura R7. El efecto de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral *in vivo* es reversible y desaparece al interrumpir el tratamiento. Se inyectaron de $1,5 \times 10^6$ TICs de GBM en los flancos de ratones Nude y, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño adecuado, se administró a los animales por vía oral lactato (grupo control) o dacomitinib (15 mg/Kg/día) durante 4 semanas, realizando medidas del volumen tumoral cada 4-5 días. Transcurrido dicho tiempo se interrumpió el tratamiento y se observó el crecimiento de los tumores. En los gráficos se muestra el incremento de volumen tumoral relativo al volumen tumoral inicial (en el momento de comienzo del tratamiento).

2.5 El tratamiento con dacomitinib bloquea la señalización a través de EGFR en los tumores subcutáneos

Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* indicaban que el efecto de dacomitinib era dependiente de EGFR ya que no produjo efectos sobre la línea GBM4, sin amplificación de *EGFR* y con una baja expresión proteica del receptor (Tabla R1). Para confirmar que dacomitinib estaba efectivamente actuando sobre la señalización a través de EGFR, se analizó el estado de fosforilación del receptor y de sus principales dianas moleculares mediante WB e inmunofluorescencia en los tumores tratados con el inhibidor y con lactato. Los resultados mostraron la defosforilación de varios residuos tirosina de EGFR (Y1068, Y1045 e Y992) en los tumores tratados con dacomitinib, tanto generados por la línea GBM1 (con *EGFR* amplificado) (Figuras R8A y R8B) como por la GBM3 (con *EGFR* amplificado y la variante EGFRvIII) (Figura R8B).

Sin embargo, el análisis del estado de fosforilación de las moléculas por debajo del receptor no evidenció un descenso notable de la activación de dichas vías de señalización, siendo detectable tan solo una ligera tendencia en cuanto a la inhibición de la fosforilación de las proteínas AKT y S6 en los tumores tratados con dacomitinib al ser comparados con los controles (Figura R9). Los niveles de cada una de las proteínas analizadas fueron representados mediante “mapas de calor”, permitiendo asignar un color a cada proteína en función de la intensidad de señal proporcionada en cada condición experimental (media de los distintos tumores generados

Resultados

por la misma línea de TICs de GBM y con el mismo tratamiento: lactato o dacomitinib) y normalizada frente a los niveles proteicos de GAPDH. Así pues, las proteínas más abundantes se representaban mediante rectángulos de color rojo; las de expresión media, de color amarillo y aquellas presentes en menos cantidad, de color verde. En este punto cabe destacar la gran variabilidad existente entre los tumores generados por la misma línea celular de GBM y pertenecientes al mismo grupo de tratamiento. Asimismo, el análisis histológico de los tumores control evidenció que estos presentaban grandes áreas de tejido necrótico (debido al gran tamaño que alcanzaban en presencia de lactato) que podrían estar alterando la activación de las distintas rutas de señalización.

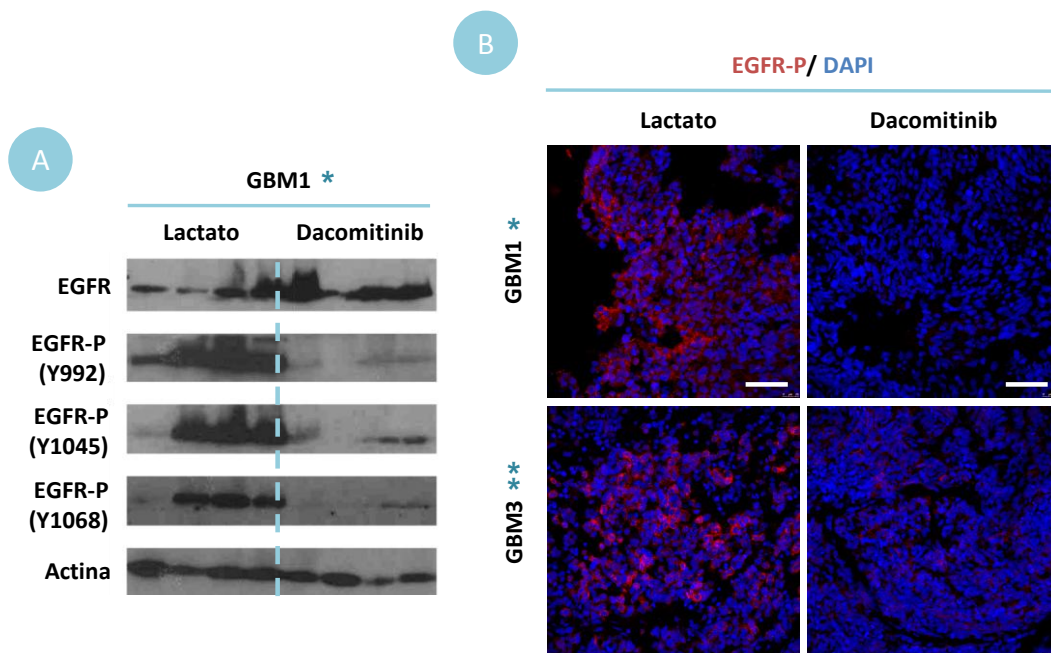


Figura R8. Dacomitinib reduce la activación de EGFR en los tumores subcutáneos generados por TICs de GBM. (A) Análisis por WB del estado de fosforilación de los residuos tirosina de EGFR en los tumores generados por la línea GBM1 y tratados con lactato o con dacomitinib. (B) Imágenes representativas de confocal de las tinciones inmunofluorescentes de EGFR-P (Y1068) en el tejido de los tumores generados por las líneas GBM1 y GBM3, tratados con lactato o dacomitinib. Barra de escala: 50 μm.

Estos resultados sugirieron la necesidad de analizar el efecto del tratamiento con dacomitinib a corto plazo (en tumores de menor tamaño) sobre las principales rutas de señalización activadas por EGFR. Para ello, se inyectaron células de GBM en los flancos de ratones Nude de manera análoga a como se había realizado en el experimento anterior y cuando los tumores fueron visibles y de un tamaño adecuado, se inició el tratamiento con lactato o dacomitinib (15 mg/Kg/día) que se prolongó durante 5 días consecutivos. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados 3 h después de la administración de la última dosis y los tumores extraídos para su análisis. Esta pauta de 5 días se decidió en base a los análisis de

señalización realizados por Hegi, M.E. y colaboradores sobre muestras de GBM tratadas con gefitinib (Hegi et al. 2011).

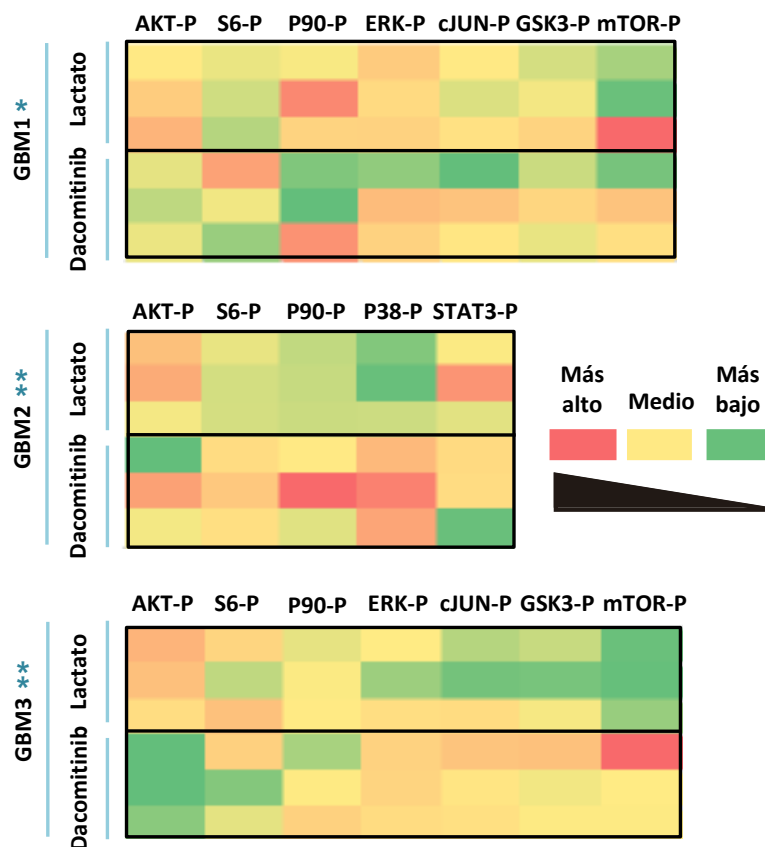


Figura R9. A largo plazo dacomitinib disminuye ligeramente la señalización a través de algunas de las moléculas diana de EGFR. Mapa de colores en el que se muestran los niveles de expresión de las distintas fosfoproteínas analizadas en los tumores generados por las líneas GBM1, GBM2 y GBM3 tratados con lactato o dacomitinib. Los rectángulos de color rojo indican niveles de proteína más elevados, los de color amarillo corresponden a niveles intermedios y los de color verde representan niveles bajos.

En primer lugar, se confirmó mediante inmunofluorescencia que dacomitinib era capaz de inhibir la fosforilación de EGFR (Y1068) y la subyacente señalización a través de sus principales dianas moleculares en los tumores generados por la línea GBM1 (con *EGFR* amplificado) (Figura R10A). A continuación, se detectó una clara reducción de los niveles de activación de las proteínas AKT, ERK y S6 en los tumores tratados con el inhibidor, con excepción de los generados por la línea GBM4 en los que no se encontró un efecto significativo (Figura R10B).

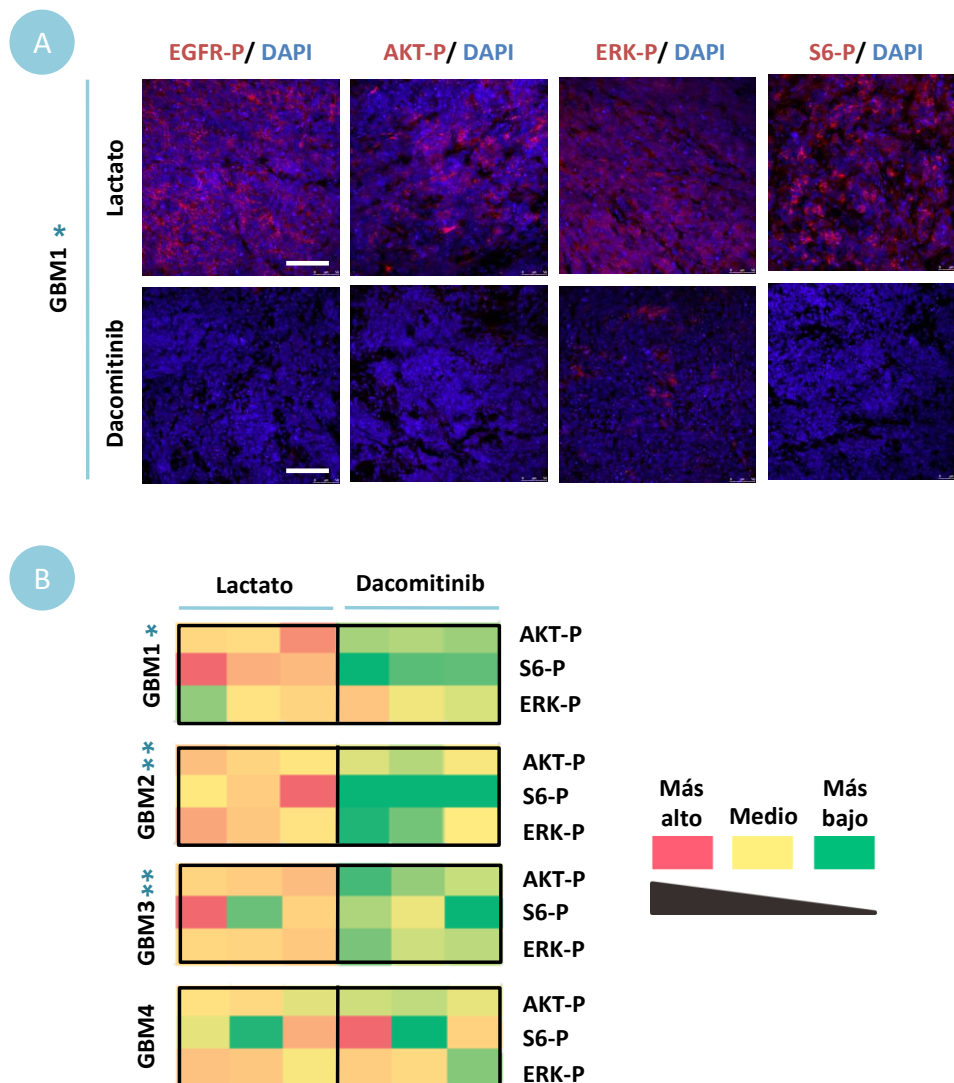


Figura R10. El tratamiento con dacomitinib durante 5 días bloquea la señalización a través de EGFR en los tumores subcutáneos generados por líneas de GBM con amplificación de *EGFR*. (A) Imágenes de confocal representativas de las tinciones inmunofluorescentes de las proteínas fosforiladas realizadas en el tejido de los tumores generados por la línea GBM1 y tratados durante 5 días con lactato o dacomitinib. (B) Niveles de expresión de las distintas proteínas fosforiladas analizadas por WB en el tejido de los tumores generados por las líneas de GBM y tratados durante 5 días con lactato o dacomitinib. Barra de escala: 50 μ m.

2.6 El tratamiento con dacomitinib reduce la capacidad de formación de tumores intracraneales de las TICs de GBM con amplificación de *EGFR*

Con el objetivo de determinar si el tratamiento sistémico con dacomitinib es capaz de prevenir el crecimiento tumoral intracraneal, se inyectaron 50.000 células de las líneas GBM1 y GBM3 en el estriado de ratones Nude. Transcurridas dos (GBM3) o tres semanas (GBM1) desde el momento de la inyección, los animales fueron separados en dos grupos a los que se administró lactato (control) o dacomitinib por vía oral (15 mg/Kg/día). El análisis de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que la inhibición de EGFR prolongaba la supervivencia de los animales (Figura R11A). Además, en algunos casos, a pesar de la muerte de los animales, los tumores formados eran mucho más pequeños en el grupo tratado con dacomitinib que en el

grupo control, tal y como se observó al teñir los cerebros inyectados con las células GBM1 y GBM3 con un anticuerpo específico anti-Vimentina humana (Figura 11A). Asimismo, en la línea GBM3 se pudo realizar un seguimiento del crecimiento de los tumores mediante imágenes de RMN con contraste de los dos grupos experimentales transcurridos 23 y 30 días desde el momento de la inyección de las TICs de GBM. Las imágenes mostraron como dacomitinib inhibe claramente el crecimiento tumoral (Figura R11B).

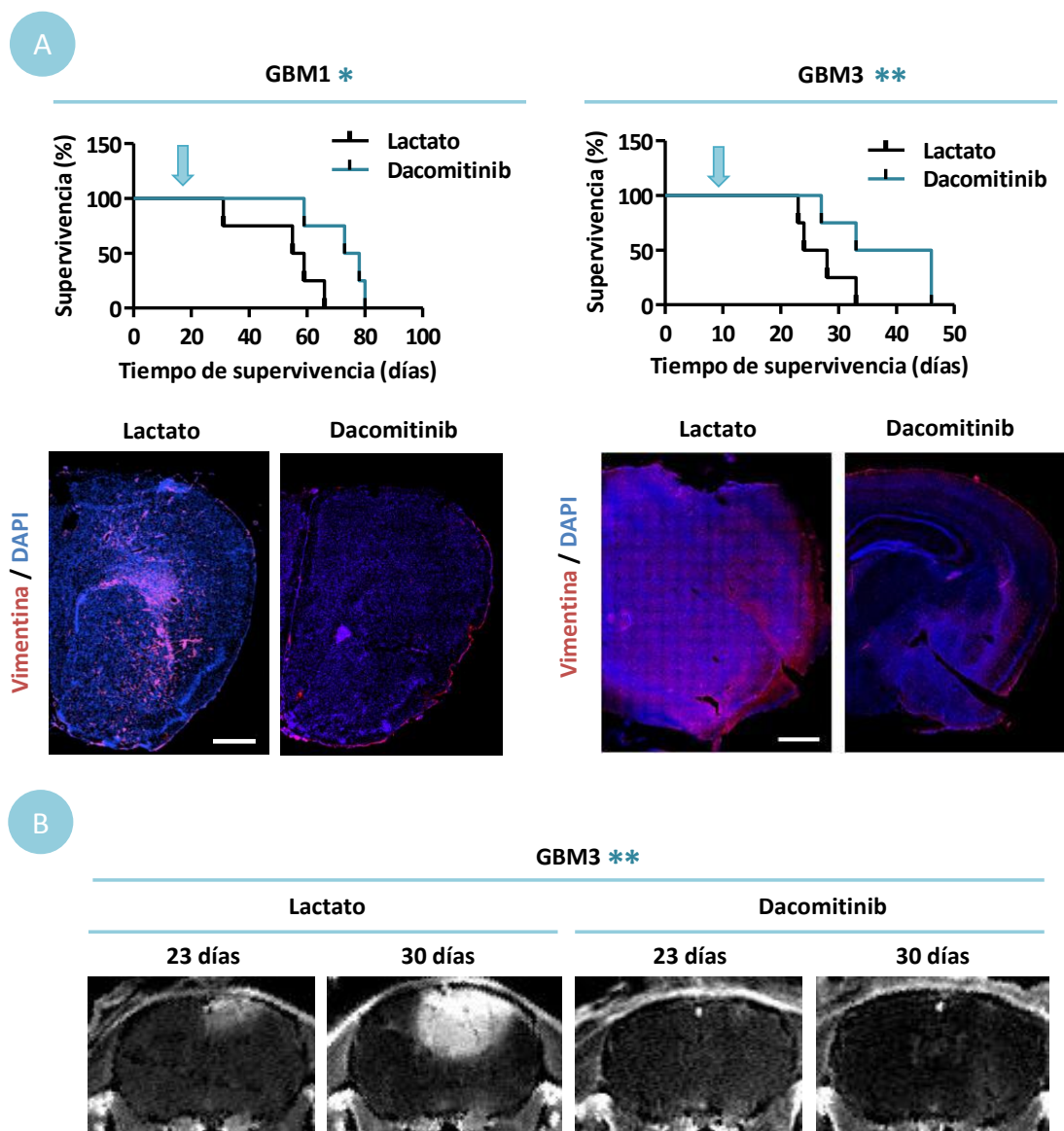


Figura R11. El tratamiento con dacomitinib reduce el crecimiento tumoral e incrementa la supervivencia en modelos de crecimiento intracraneal. (A) Se inyectaron 50.000 células de las líneas GBM1 o GBM3 en el estriado de ratones Nude y 2 o 3 semanas después fueron tratados con lactato o dacomitinib (15 mg/Kg/día); el inicio de tratamiento se indica con una flecha. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier fueron analizadas mediante un test de Log-rank ($n = 5$; $p = 0,049$ (GBM1) y $p = 0,028$ (GBM3)). Las imágenes en la parte inferior muestran tinciones representativas con anti-Vimentina humana de los tumores formados. (B) Imágenes representativas de RMN con contraste de los cerebros inoculados con las células GBM3 en distintos puntos temporales tras la inyección de las células. Barra de escala: 200 μm .

Asimismo, se detectó una disminución de los niveles de fosforilación de EGFR (Y1068) y de algunas de sus dianas moleculares (AKT, ERK y S6) en los tumores tratados con dacomitinib, confirmando los resultados obtenidos previamente en los tumores subcutáneos (Figura R12). Estos datos indican, por tanto, que el tratamiento sistémico con dacomitinib es capaz de llegar al parénquima cerebral en la concentración suficiente para inhibir de forma efectiva la señalización a través de EGFR en los xenoinjertos de GBM, reducir el crecimiento tumoral e incrementar la supervivencia de los animales.

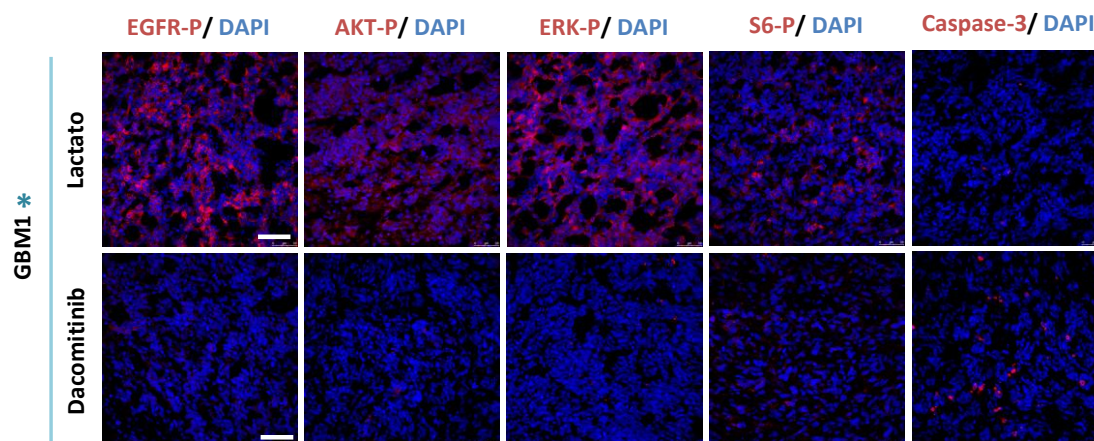


Figura R12. El tratamiento con dacomitinib reduce la activación de EGFR y de sus principales dianas moleculares en los tumores intracraneales generados por TICs de GBM. Imágenes representativas de las tinciones inmunofluorescentes de EGFR, AKT, ERK y S6 fosforiladas y de Caspasa-3 Activada en el tejido tumoral tratado con lactato y dacomitinib. Barra de escala: 50 μ m.

2.7 La ausencia de PTEN funcional limita el efecto de dacomitinib en una línea de TICs de GBM con amplificación de *EGFR*

Se ha postulado que la activación crónica de AKT en ausencia de PTEN funcional podría mediar la resistencia a los inhibidores de EGFR en el tratamiento del GBM (Bianco et al. 2003; Haas-Kogan et al. 2005; Mellinghoff et al. 2005). Para comprobar esta hipótesis, se inyectaron $3 \cdot 10^6$ células de la línea celular primaria GBM5 (con amplificación de *EGFR* y *PTEN* delecionado) en los flancos de ratones inmunodeprimidos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño mínimo, se administró lactato o dacomitinib a los animales de forma sistémica y se procedió a medir el tamaño de los tumores durante 4 semanas (cada 4-5 días) hasta que los animales fueron sacrificados. Se observó un efecto limitado del tratamiento con dacomitinib, sin encontrar diferencias significativas (respecto a los controles) en el crecimiento de los tumores generados por dicha línea celular (Figura R13).

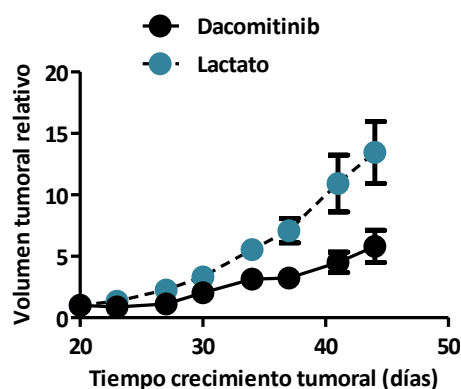


Figura R13. El tratamiento con dacomitinib no produce un efecto significativo en el crecimiento tumoral de una línea celular de GBM con *PTEN* deletado. La línea celular primaria GBM5 (1×10^6 células) fue inyectada en los flancos de ratones Nude. Cuando los tumores hubieron alcanzado un tamaño visible y adecuado, se administró por vía oral una dosis diaria de dacomitinib (15 mg/Kg/día, 5 días/semana) o vehículo (lactato) y se midió el volumen tumoral cada 4-5 días hasta el momento en el que se sacrificaron los animales. En la parte superior se muestran las curvas de crecimiento de los tumores subcutáneos y en la inferior, una imagen macroscópica representativa de los tumores formados en el punto final del experimento.

Por otro lado, un grupo de animales fue tratado con lactato o dacomitinib durante 5 días y los tumores fueron extraídos 3 h después de la administración de la última dosis de tratamiento. El análisis del tejido mostró una disminución de la fosforilación de EGFR en aquellos tumores tratados con dacomitinib. A pesar de ello no se observaron variaciones significativas en los niveles de fosforilación de AKT, ERK Y S6 (Figura R14A). Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis de los extractos proteicos del tejido tumoral por WB (Figura R14B).

Los resultados obtenidos sugirieron que dacomitinib era capaz de inhibir la actividad tirosina quinasa de EGFR en ausencia de *PTEN* funcional y que, sin embargo, esto no era suficiente para bloquear la señalización subsecuente a través de las principales moléculas efectoras por debajo del receptor. Esto permitiría explicar el poco efecto de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral de esta línea de GBM *in vivo*. Además, este hallazgo también permitiría seleccionar mejor el grupo de pacientes a tratar en futuros ensayos clínicos con el inhibidor.

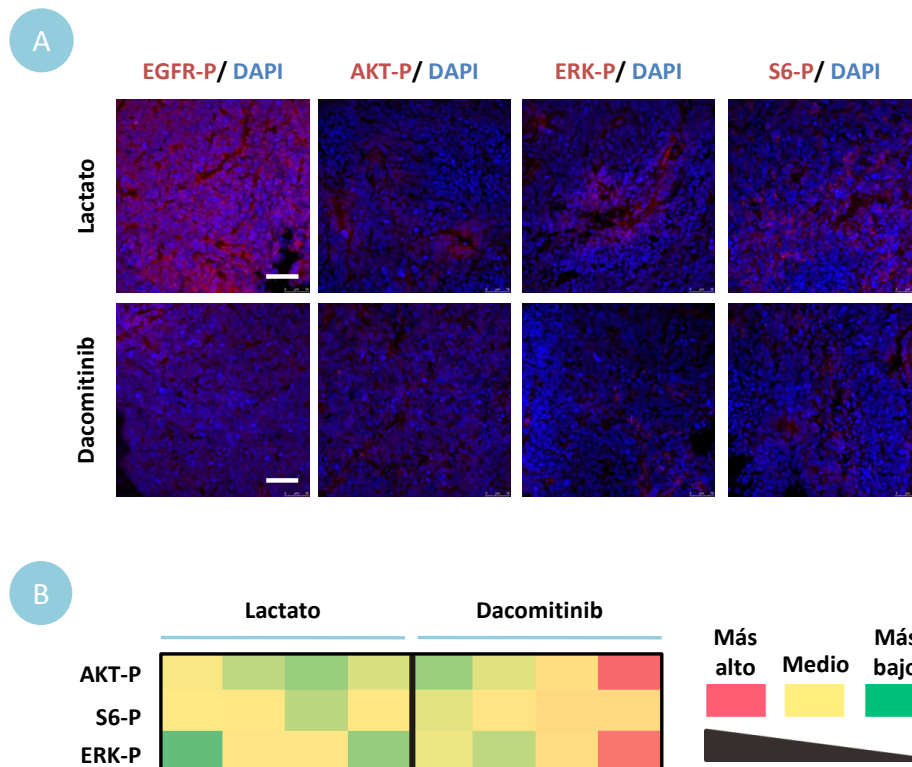


Figura R14. El tratamiento con dacomitinib inhibe la fosforilación de EGFR pero no la señalización a través de sus principales moléculas efectoras en una línea celular de GBM con *PTEN* deletado. La línea celular primaria GBM5 ($1 \text{ a } 3 \cdot 10^6$ células) fue inyectada en los flancos de ratones Nude. Cuando los tumores hubieron alcanzado un tamaño visible y adecuado, se administró por vía oral una dosis diaria de dacomitinib (15 mg/Kg/día, 5 días/semana) o vehículo (lactato) durante 5 días. Los tumores fueron extraídos 3 h después de la administración de la última dosis del tratamiento para analizar el estado de activación de la vía de señalización de EGFR (A) *in situ* mediante técnicas de inmunofluorescencia o (B) en los extractos proteicos mediante WB. En la figura se muestra el “mapa de calor” de la cuantificación de los niveles de fosforilación de las proteínas analizadas, normalizados frente a los niveles de GAPDH. Barra de escala: 50 μm .

2.8 Dacomitinib reduce la agresividad y la expresión de marcadores de célula madre en los tumores con amplificación de *EGFR*

Estudios previos han demostrado que la elevada expresión de EGFR es un marcador de célula madre y progenitor neural (Ciccolini et al. 2005; Pastrana et al. 2009). De hecho, la presencia del receptor en la membrana celular puede ser utilizado como marcador de una subpoblación altamente agresiva de TICs de GBM (Mazzoleni et al. 2010) y su señalización se ha relacionado recientemente con el control de la expresión de marcadores de célula madre en este tipo de tumores (Jin et al. 2011). Cabe destacar que los análisis histológicos de las tinciones de H-E del tejido de los tumores subcutáneos tratados con dacomitinib sugirió un fenotipo menos agresivo y más diferenciado (con presencia de células más pequeñas y con menos atipia nuclear) al compararlos con los controles (Figura R15A). Esta primera observación condujo a realizar un análisis de expresión por qRT-PCR de los principales marcadores moleculares de células madre (*CD133*, *ID1*, *Nanog*, *Nestin*, *Sox2*, *LIF* e *IL-11*). A pesar de la gran variabilidad existente entre los

tumores, se detectó una clara inhibición de la expresión de algunos de los marcadores tanto en los xenoinjertos tratados durante 4 semanas (Figura R15B) como en aquellos que habían recibido el tratamiento corto de 5 días (Figura R16).

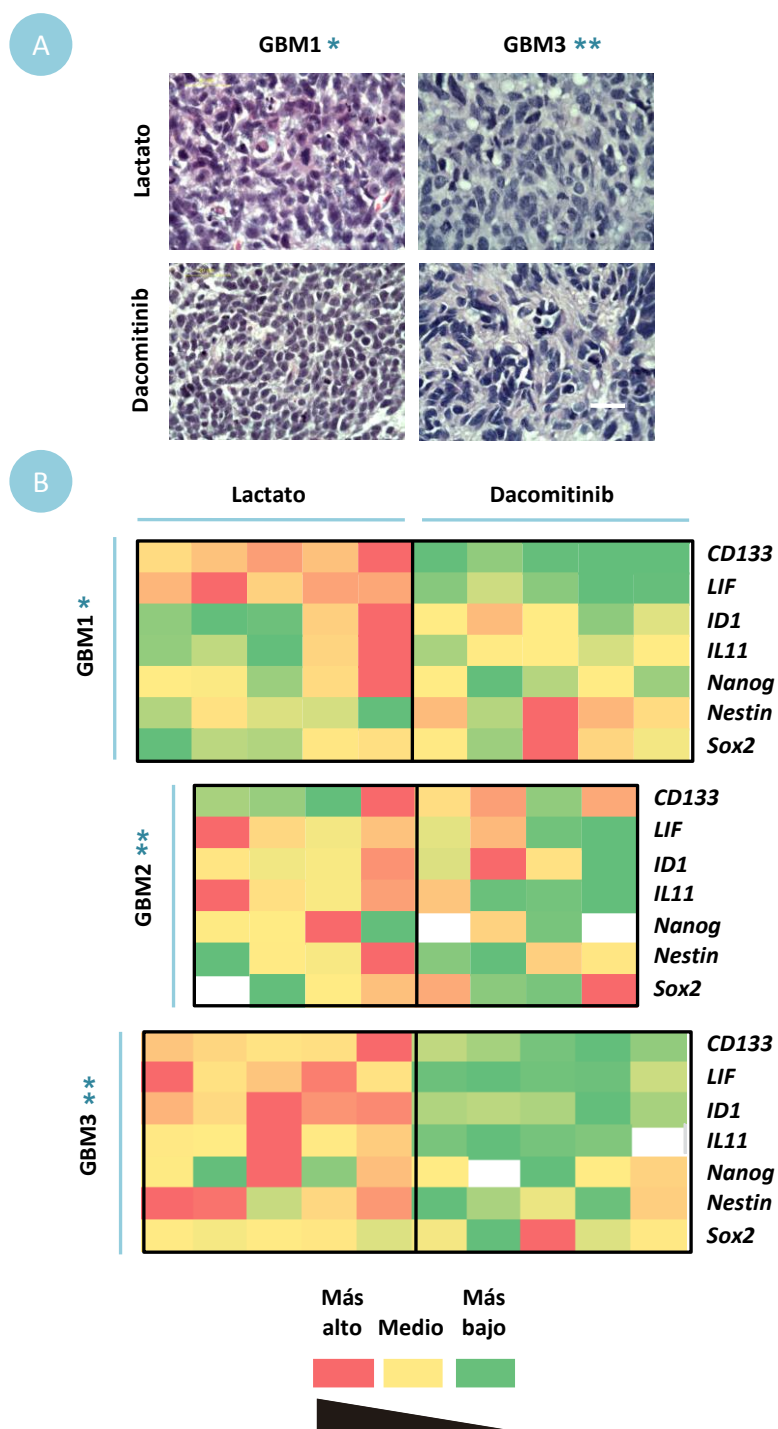


Figura R15. Dacomitinib reduce la agresividad y la indiferenciación de los tumores generados por TICs de GBM *in vivo*. (A) Tinciones de H-E del tejido tumoral control o tratado con dacomitinib. (B) “Mapa de calor” de la expresión de marcadores de células madre en los tumores tratados durante 4 semanas con lactato o dacomitinib, analizados mediante qRT-PCR. Barra de escala: 10 μ M.

Sin embargo, no se hallaron cambios significativos en los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación característicos de células maduras del SNC (*GFAP δ* , *GFAP α* , *OSP*, *β IIIITub*, *GIRDN*) analizados en los tumores tratados con dacomitinib (Figura R17).

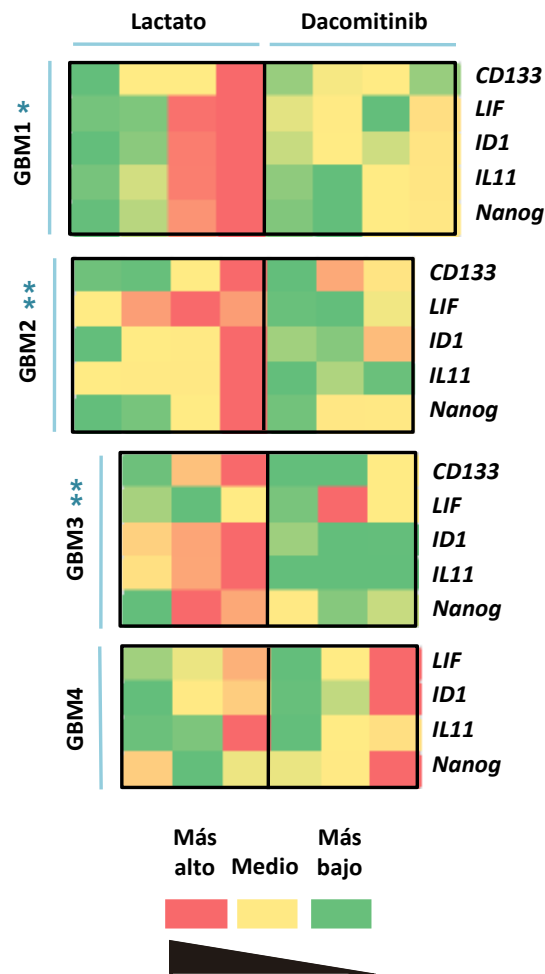


Figura R16. El tratamiento corto con dacomitinib reduce la expresión de marcadores de células madre en los tumores generados por TICs de GBM *in vivo*. “Mapa de calor” de la expresión de ARNm de marcadores de células madre en los tumores subcutáneos tratados durante 5 días con lactato o dacomitinib, analizados mediante qRT-PCR.

Los resultados derivados del análisis del efecto de dacomitinib en modelos preclínicos de GBM indican que el inhibidor es eficiente bloqueando la señalización a través de EGFR y que esto se traduce en un bloqueo del crecimiento tumoral *in vivo* y en una mayor supervivencia de los animales a los que se ha realizado trasplantes intracraneales de TICs de GBM. Además, se ha observado que dacomitinib es efectivo sobre aquellas líneas de GBM con amplificación de *EGFR* (independientemente de la presencia de la forma mutante *EGFRvIII*) y que, en consecuencia, son dependientes de la señalización a través del receptor. Sin embargo, esta efectividad se ve reducida en ausencia de la expresión de *PTEN*, siendo capaz de bloquear la activación de EGFR pero no la señalización subyacente ni el crecimiento tumoral *in vivo*.

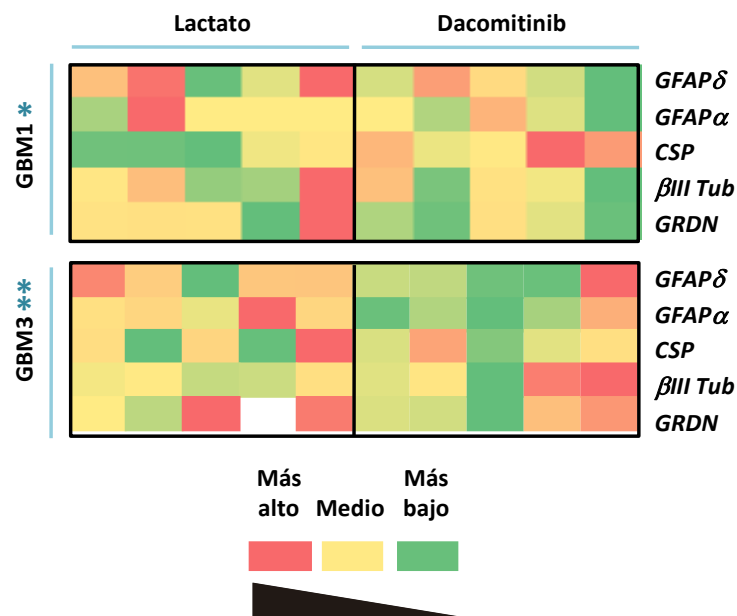


Figura R17. Dacomitinib no produce una reducción notable de los marcadores de diferenciación en los tumores generados por TICs de GBM *in vivo*. “Mapa de calor” de los niveles de expresión de marcadores de diferenciación característicos de células maduras del SNC en los tumores tratados durante 4 semanas con lactato o dacomitinib, analizados mediante qRT-PCR.

Así pues, nuestros resultados sugieren que la inhibición de EGFR tras el tratamiento con dacomitinib produce una diferenciación de las TICs de GBM que, sin embargo, debe ser reversible ya que se recupera el crecimiento tumoral en cuanto se deja de administrar el tratamiento a los animales. Por ello, se decidió explorar una estrategia alternativa que favoreciera la degradación del receptor más que la inhibición de su actividad quinasa: la inhibición de DYRK1A.

3. Efecto de la inhibición de DYRK1A en el comportamiento de las TICs de GBM

3.1 Las líneas celulares de TICs de GBM expresan distintos niveles de DYRK1A

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron 6 de las líneas primarias de TICs de GBM capaces de generar tumores al ser inyectadas en ratones Nude (Figura R1). En primer lugar, se determinaron los niveles de proteína (Figura R18A) y de expresión de ARNm (Figura R18B) de *DYRK1A* en dichas líneas celulares. Se pudo comprobar que existe una gran variabilidad en la expresión de la quinasa, siendo prácticamente indetectable en GBM7 que fue considerada como la línea de TICs de GBM negativa para *DYRK1A* en los ensayos posteriores.

Además, como ya se mencionó anteriormente, dichas líneas se habían caracterizado a nivel de amplificación de *EGFR*, expresión en membrana de dicho receptor y presencia de mutaciones en *P53* o deleciones de *PTEN* (Tabla R1).

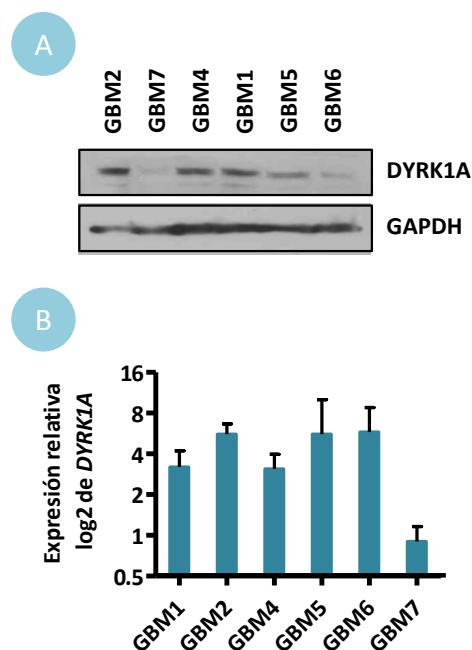


Figura R18. Caracterización de la expresión de *DYRK1A* en las líneas de TICs de GBM. (A) Expresión proteica de *DYRK1A* en las líneas de TICs de GBM. (B) Niveles transcripcionales de *DYRK1A* relativos a *HPRT* y normalizados respecto a la expresión de *DYRK1A* en tejido cerebral normal.

3.2 La interferencia de *DYRK1A* en TICs de GBM suprime su capacidad de autorrenovación *in vitro*

Con la finalidad de evaluar si los niveles de *DYRK1A* eran capaces de modular el comportamiento de las TICs de GBM *in vitro*, se utilizó la estrategia del silenciamiento génico en las líneas GBM1, GBM5 y GBM7. Inicialmente se intentó utilizar construcciones lentivirales que permitían la expresión estable de los ARNi (ARN de interferencia) en las células seleccionadas. Sin embargo, esta aproximación no dio buenos resultados en los cultivos de TICs de GBM, por lo que se optó por la utilización de construcciones lentivirales inducibles con expresión condicional del ARN de interferencia para el silenciamiento de *DYRK1A* (*DYRK1Ash*). Las células infectadas se seleccionaron en presencia de puomicina y la expresión de la proteína roja fluorescente (TurboRFP) se utilizó como reportero de la expresión del ARNsh tras la inducción del mismo al incubar las células con doxiciclina. El análisis por qRT-PCR demostró una reducción parcial de los niveles de ARNm de *DYRK1A* en los cultivos de TICs de GBM1 y GBM5 (Figura R19A), que

correlacionaba con una disminución del número de células con expresión de EGFR a nivel de proteína (Figura R19B) pero sin producirse alteraciones en los niveles de ARNm del receptor (Figura R19C).

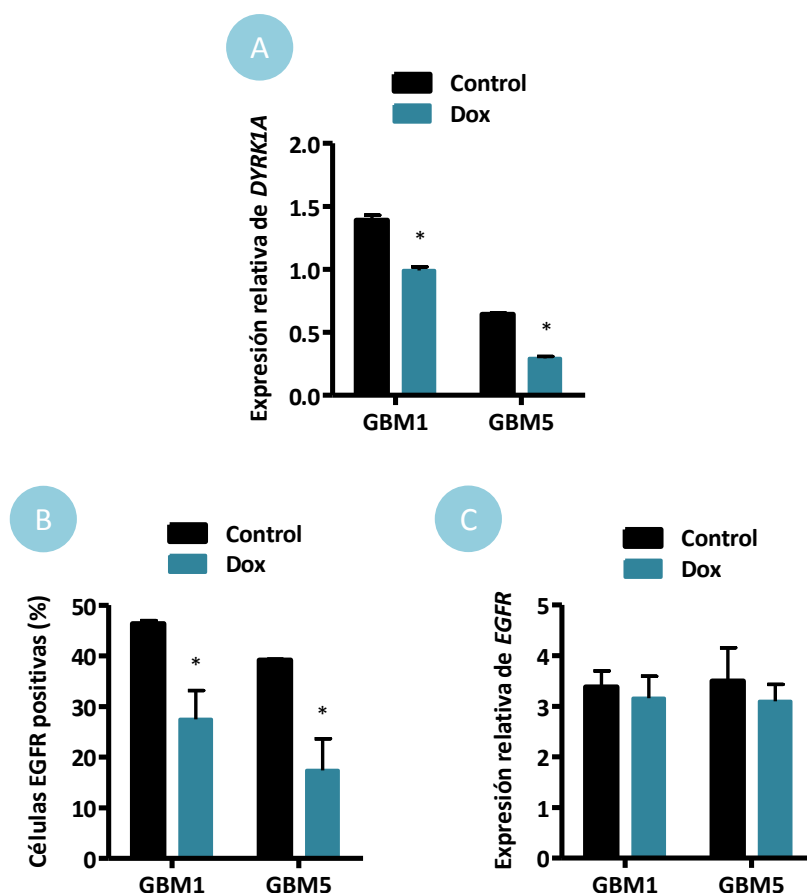


Figura R19. La interferencia condicional de *DYRK1A* disminuye los niveles proteicos de EGFR sin afectar a los niveles de ARNm del receptor. (A) Análisis de los niveles transcripcionales de *DYRK1A* a las 72 h de la inducción del *DYRK1Ash* con doxiciclina (Dox). (B) Análisis por citometría de flujo de la proporción de células EGFR-positivas 72 h después de la inducción del *DYRK1Ash*. (C) Análisis por qRT-PCR de los niveles transcripcionales de *EGFR* 72 h después de la inducción del *DYRK1Ash*. * $p \leq 0,05$.

Transcurridas 72 h desde el momento de la inducción de *DYRK1Ash* con doxiciclina, las esferas fueron disociadas y sembradas de nuevo a densidad clonal en ausencia del antibiótico para evaluar su capacidad de formación de esferas secundarias (o capacidad de autorrenovación). La interferencia de *DYRK1A* redujo claramente la capacidad de autorrenovación de las líneas GBM1 y GBM5. Como control, la inducción del *DYRK1Ash* no tuvo efecto en la capacidad clonal de la línea GBM7, que no expresa *DYRK1A* y presenta niveles muy bajos de EGFR (Figura R20). Estos datos indican que los niveles de *DYRK1A* son esenciales para la expansión y el crecimiento clonal de las TICs de GBM y que su efecto, al igual que ocurre en las NSCs, podría depender de la regulación de la estabilidad de EGFR.

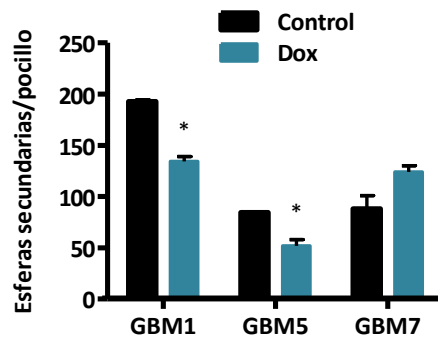
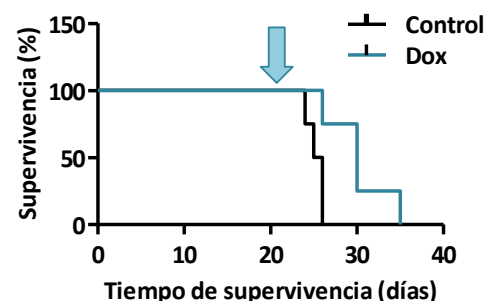


Figura R20. La interferencia condicional de *DYRK1A* reduce la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM dependientes de EGFR. Cuantificación de la capacidad de formación de esferas secundarias tras la eliminación de doxiciclina del medio de cultivo. * $p \leq 0,05$

3.3 La interferencia de *DYRK1A* disminuye la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM *in vivo*

Tras la observación del efecto de la disminución de los niveles de *DYRK1A* *in vitro*, se quiso comprobar si dicha inhibición se traduciría en una disminución de la capacidad de las TICs de GBM para formar tumores *in vivo*. Para ello, se inyectaron 50.000 células de la línea GBM5, previamente infectadas con la construcción lentiviral *DYRK1Ash* (GBM5-*DYRK1Ash*) y seleccionadas con puromicina, en el cerebro de ratones Nude. Tres semanas más tarde, los ratones fueron divididos en dos grupos y a uno de ellos se le administró doxiciclina en el agua de bebida para lograr la inducción del *DYRK1Ash*. Cuando los animales presentaron síntomas severos de enfermedad, fueron sacrificados obteniendo unas curvas de supervivencia que se analizaron con un test de Kaplan-Meier con el que se demostró que la disminución de los niveles de *DYRK1A* prolongaba significativamente la supervivencia de los animales trasplantados con TICs de GBM (Figura R21).

Figura R21. La interferencia condicional de *DYRK1A* incrementa la supervivencia de los ratones con trasplante intracraneal de TICs de GBM. 50.000 células de la línea GBM5 previamente infectadas con la construcción *DYRKsh* (GBM5-*DYRK1Ash*) fueron inyectadas intracranealmente en ratones Nude y tres semanas más tarde se administró doxiciclina en el agua de bebida (indicado en el gráfico con la flecha azul) a uno de los dos grupos de animales. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una curva de supervivencia de Kaplan-Meier y las diferencias entre los tiempos de supervivencia mediante un test de Log-Rank ($n=5$; $p=0,003$).



Para continuar con el análisis del efecto de la interferencia de *DYRK1A* en la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM *in vivo*, se inyectaron $3,5 \cdot 10^6$ células GBM5-*DYRK1Ash* en cada flanco de ratones Nude y, cuando los tumores fueron visibles y de un tamaño mínimo adecuado,

los animales se separaron en dos grupos experimentales: control y tratado con doxiciclina, y se realizó un seguimiento de los mismos durante 3 semanas adicionales, efectuando medidas de los tumores cada 4 o 5 días. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a la extracción de los tumores y se observó que los tratados con doxiciclina eran de menor tamaño que los controles, demostrando que la inducción de la interferencia de *DYRK1A* inhibía claramente la progresión tumoral (Figuras R22A y R22B).

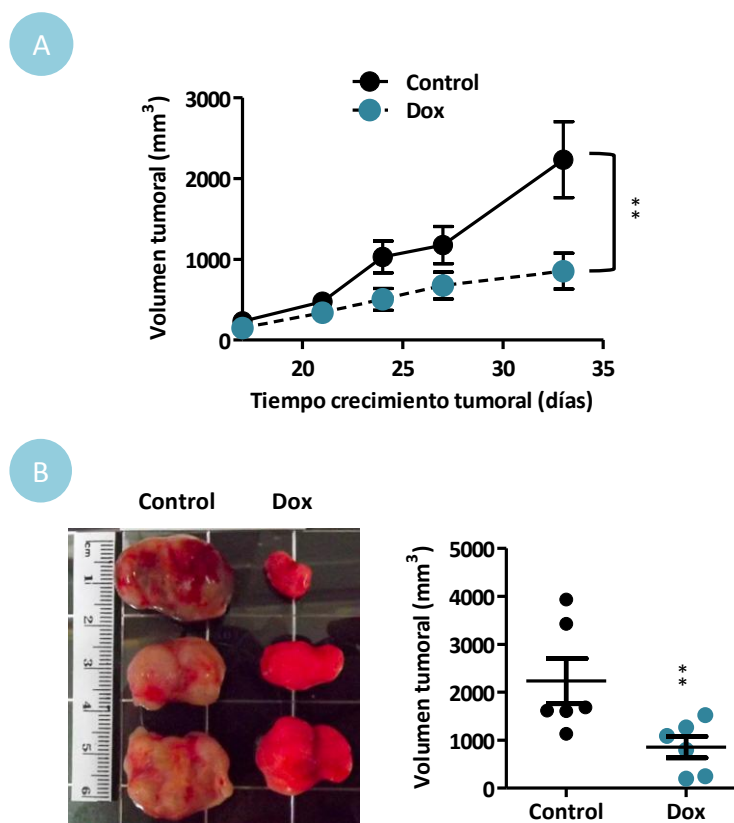


Figura R22. La interferencia condicional de *DYRK1A* afecta a la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM *in vivo*. (A) $3,5 \cdot 10^6$ células GBM5-*DYRK1A*^{ash} fueron inyectadas en los flancos de ratones Nude. Dos semanas después se añadió doxiciclina al agua de bebida de unos de los grupos de animales y se midió el tamaño de los tumores cada 4 o 5 días. En el gráfico se muestra el volumen tumoral tras iniciar la administración de doxiciclina. (B) En la fotografía de la izquierda se observan tumores subcutáneos representativos generados por las células GBM5-*DYRK1A*^{ash} de las dos condiciones experimentales (control y con doxiciclina). En el gráfico de la derecha se muestran los volúmenes tumorales en el punto final del experimento. ** $p \leq 0,01$.

El análisis del tejido de los tumores subcutáneos mediante WB mostró una reducción de los niveles proteicos de *DYRK1A* en los tumores tratados con doxiciclina, que se correspondía con una disminución en los niveles de EGFR (Figura R23A) pero que no afectaba a los niveles transcripcionales del receptor (Figura R23B).

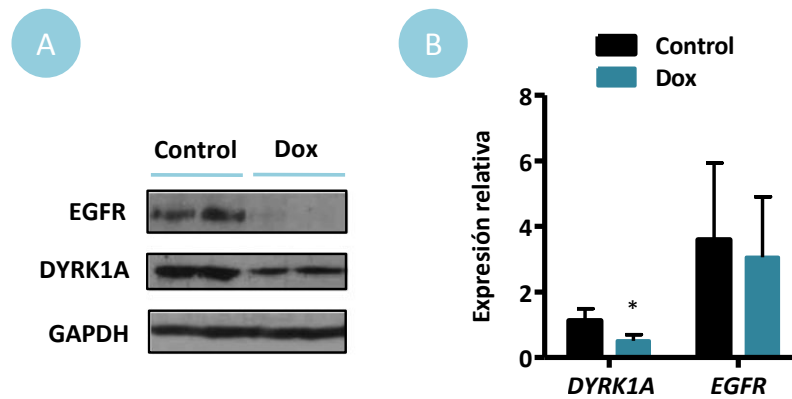


Figura R23. La interferencia condicional de *DYRK1A* reduce los niveles de EGFR de las TICs de GBM *in vivo*. (A) Análisis de los niveles proteicos de DYRK1A y EGFR en los tumores control y tratados con doxiciclina mediante WB. (B) Análisis por qRT-PCR de los niveles transcripcionales de *DYRK1A* y *EGFR* en los tumores control y tratados con doxiciclina. * $p \leq 0,05$.

Los análisis del tejido realizados mediante inmunofluorescencia mostraron una disminución de las células proliferativas (con incorporación de BrdU) y un incremento de las células apoptóticas (positivas para la tinción de Caspasa-3 activada) en los tumores tratados con doxiciclina en comparación con los controles (Figuras R24A y R24B). Estos resultados indican que *DYRK1A* controla la expansión de las TICs de GBM *in vivo* y que su silenciamiento previene el crecimiento y la supervivencia tumoral y, en consecuencia, disminuye la carga tumoral.

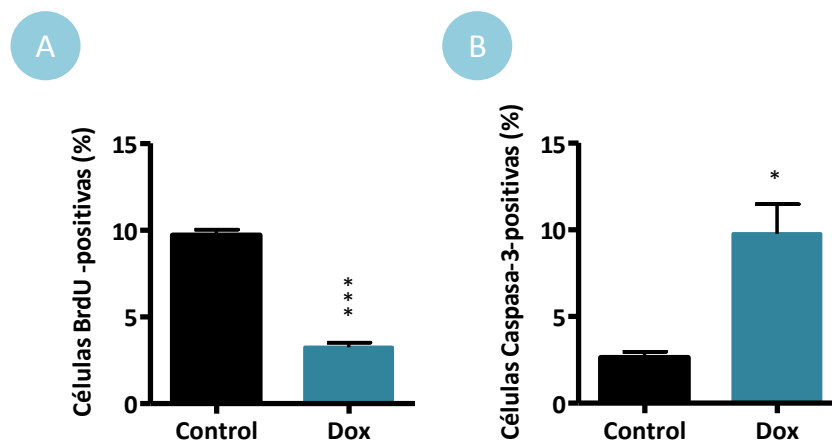


Figura R24. La interferencia condicional de *DYRK1A* reduce la proliferación e incrementa la apoptosis de las TICs de GBM *in vivo*. (A) Porcentaje de células proliferativas (que incorporan BrdU) en los tumores subcutáneos. (B) Porcentaje de células apoptóticas (con tinción de Caspasa-3 activada) en los tumores subcutáneos. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$.

3.4 La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A bloquea la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM *in vitro*

Para determinar el potencial terapéutico de DYRK1A era importante dilucidar la relevancia de su actividad quinasa en la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM. Con esta finalidad se utilizó harmina, un alcaloide de la familia de las β -carbolinas inhibidor de la actividad quinasa de DYRK1A (Bain et al. 2007). Los cultivos de TICs de GBM se incubaron durante 72 h en presencia de harmina a una concentración de 20 μ M en el medio de cultivo y, transcurrido dicho tiempo, las esferas formadas fueron disociadas y sembradas a densidad clonal en ausencia de la droga. El recuento de las esferas secundarias originadas mostró que harmina era capaz de inhibir la capacidad de autorrenovación en la mayoría de las líneas primarias utilizadas. Es interesante destacar que el efecto no fue significativo en la línea GBM7, que apenas expresa DYRK1A (Figura R25A), confirmando la especificidad del efecto de harmina sobre los cultivos. Estos resultados fueron confirmados mediante el uso de un derivado del benzotiazol denominado INDY, inhibidor de la actividad quinasa de DYRK1A (Ogawa et al. 2010) (Figura R25B). Todo lo anterior sostiene que la actividad quinasa de DYRK1A es necesaria para la autorrenovación de las TICs de GBM *in vitro* y apoya su posible uso como diana terapéutica en este tipo de tumores.

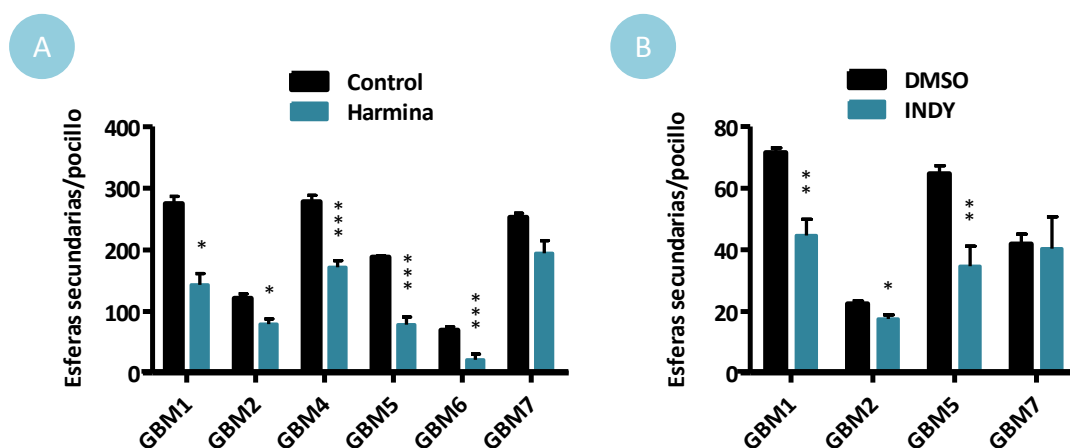


Figura R25. La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A afecta a la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM. Los cultivos de TICs de GBM fueron incubados en presencia de (A) harmina o de (B) INDY (a una concentración de 20 μ M) y 72 h después las esferas fueron disociadas y resembradas a densidad clonal y en ausencia de la droga para evaluar su capacidad de autorrenovación. En los gráficos se muestra el número de esferas secundarias originadas en cada condición experimental. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

3.5 El efecto de harmina sobre la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM depende de la expresión de EGFR

Con el objetivo de identificar algún posible patrón de respuesta a la inhibición de DYRK1A, con independencia de los niveles de expresión de la quinasa en el tumor, se analizó el fondo genético de las distintas líneas de TICs de GBM. Los resultados obtenidos indicaron que harmina era capaz de inhibir la formación de esferas clonales secundarias con independencia de la

deleción de *PTEN* o la presencia de mutaciones en *P53* (Tabla R1), dos alteraciones típicas en GBM. Sin embargo, se encontró una correlación importante entre los niveles de EGFR en la superficie celular y la sensibilidad a harmina (Figura R26A).

Esto refuerza la hipótesis de que la actividad de DYRK1A modula la autorrenovación de las TICs de GBM dependientes de EGFR. Para confirmar esta idea se utilizó la línea GBM2 que pierde la amplificación génica de *EGFR* así como la expresión proteica del receptor tras largos periodos en cultivo, pero sin sufrir cambios genómicos adicionales (Figura R26B). Los resultados mostraron que la capacidad de autorrenovación de las células GBM2 que llevaban pocos pases en cultivo sí que era inhibida en presencia de harmina, mientras que la de las células que llevaban muchos pases en cultivo no se veía afectada de forma significativa (Figura R26B). Estos datos sugieren que el efecto de la inhibición de DYRK1A sobre la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM es mediado principalmente por EGFR.

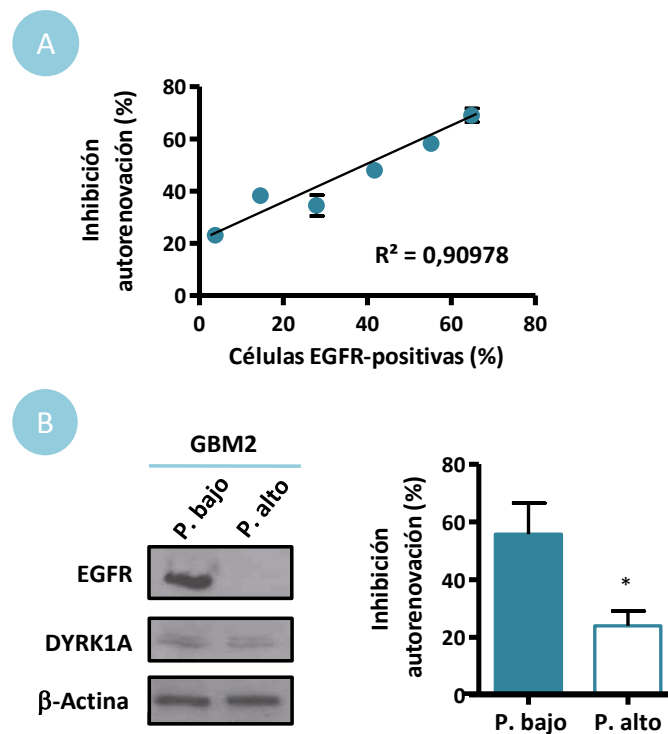
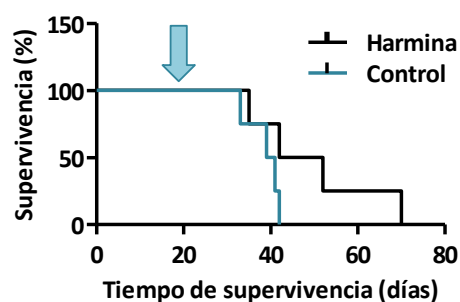


Figura R26. El efecto de la inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A sobre la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM depende de los niveles de EGFR. (A) Correlación entre los niveles de EGFR en la membrana de las distintas líneas de TICs de GBM y el porcentaje de inhibición de la autorrenovación inducido por harmina. (B) A la derecha, el gráfico representa el porcentaje de inhibición de la autorrenovación inducido por harmina en la línea GBM2 de pase corto y largo. A la izquierda, se muestran los niveles de EGFR y DYRK1A en los distintos pases, medidos por WB. Los niveles de β -Actina se utilizaron como control de carga. * $p \leq 0,05$.

3.6 La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A reduce la capacidad de formación de tumores de las TICs de GBM *in vivo*

Para corroborar la función oncogénica de DYRK1A y el beneficio terapéutico que podría implicar la inhibición de su actividad quinasa en las TICs de GBM, se inyectaron 50.000 células de la línea GBM5 en el cerebro de ratones Nude. Dos semanas después de la inyección, los ratones comenzaron a ser tratados sistémicamente con harmina intraperitoneal (15 mg/Kg/día, 5 días consecutivos por semana, seguidos por dos días de descanso) o con solución salina (grupo de animales control) y se realizó un seguimiento de su supervivencia. El análisis de las curvas de supervivencia mediante el test de Kaplan-Meier mostró que el tratamiento con harmina tenía un efecto protector (sin alcanzar el grado de significancia) en la supervivencia de los animales (Figura R27). La posibilidad de incrementar la dosis de harmina con la que se trataba a los animales se descartó debido a los efectos neurológicos (temblores) que provocaba la administración de dosis superiores (30 mg/Kg), tal y como se ha descrito previamente en distintos ensayos *in vivo* (Coates and Cox 1972; Guan et al. 2001; Lutes et al. 1988), debido al efecto de harmina sobre diversas dianas moleculares entre las que se halla la MAO-A (Kim et al. 1997), 5-HT_{2A} (del inglés *5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A*) (Glennon et al. 2000), receptores de imidazolininas (clases I1 e I2) (Husbands et al. 2001) y las CDKs (Song et al. 2004).

Figura R27. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A disminuye la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM *in vivo*. Se inyectaron 50.000 células GBM5 intracranealmente en ratones Nude. Tres semanas después se inició el tratamiento de los animales con solución salina (control) o con harmina (15 mg/Kg/día, 5 días por semana), indicado en el gráfico con la flecha azul. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los animales fueron analizadas mediante un test de Log-rank ($n = 5$; $p = 0,09$).



No obstante, a pesar de no observarse un efecto significativo sobre la supervivencia de los animales ($p = 0,09$), al analizar el tejido tumoral se detectó una disminución significativa del número de células proliferativas (número de mitosis por campo, Figura R28A), así como un incremento de las zonas apoptóticas (número de células positivas para la tinción de Caspasa-3 activada por campo, Figura R28B).

Cabe destacar que el tejido tumoral tratado con harmina presentaba un claro descenso en los niveles de EGFR detectados mediante inmunofluorescencia respecto al tejido control (Figura R29). Todo lo anterior indica que la actividad quinasa de DYRK1A regula la supervivencia de las TICs de GBM y su capacidad oncogénica, al menos en los tumores dependientes de EGFR.

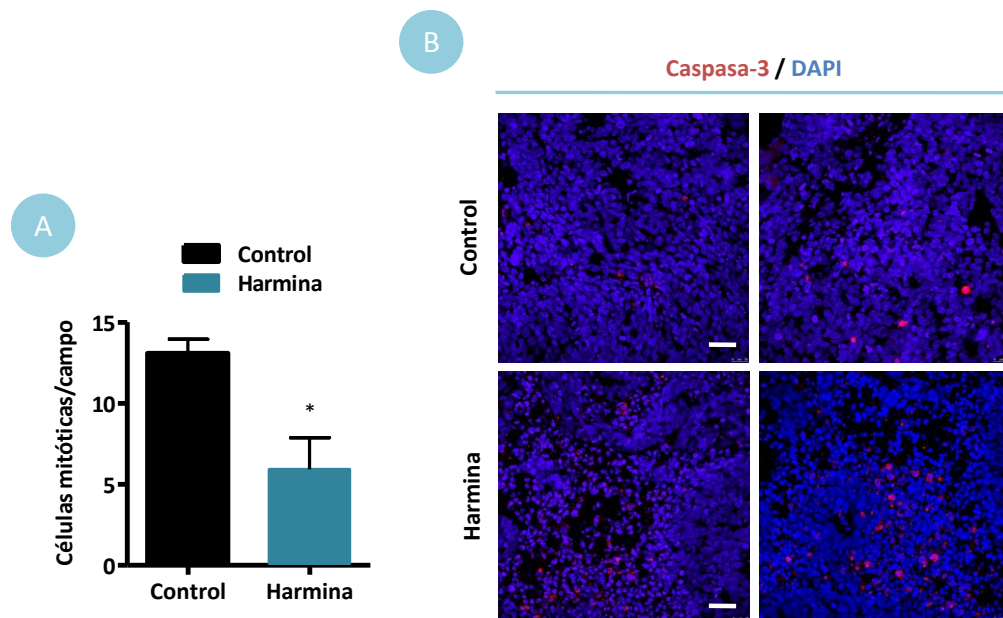


Figura R28. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A disminuye la proliferación e incrementa la apoptosis de las TICs de GBM *in vivo*. (A) Número de células mitóticas en el tejido tumoral control y tratado con harmina. (B) Imágenes representativas de las tinciones de Caspasa-3 activada en los tejidos tumorales control y tratado con harmina. Barra de escala: 40 μ M. * $p \leq 0,05$.

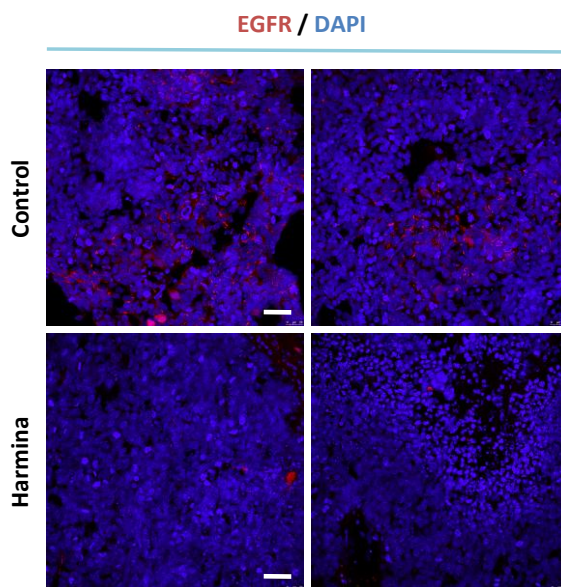


Figura R29. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A reduce los niveles de EGFR en las TICs de GBM *in vivo*. Imágenes representativas de las tinciones inmunofluorescentes de EGFR en el tejido de los tumores intracraneales control y tratados con harmina. Barra de escala: 40 μ M.

3.7 DYRK1A regula el reciclaje de EGFR en las TICs de GBM

La interferencia de *DYRK1A* parecía disminuir la cantidad de EGFR a nivel de proteína, sin efecto sobre los niveles de ARNm del receptor en las TICs de GBM, de manera análoga a lo que se había descrito previamente en las NSCs de la SEZ de ratón (Ferron et al. 2010).

Con el objetivo de confirmar este mecanismo en las TICs de GBM, se utilizó tanto la aproximación de la interferencia condicional de *DYRK1A* en la línea GBM1-*DYRK1A*^{Ash} (Figura R30), como la inhibición farmacológica de su actividad quinasa con harmina en las líneas GBM1 y

GBM5 (Figura R31). Los resultados mostraron que tanto la disminución de los niveles de DYRK1A como la inhibición de su actividad quinasa aceleraban la tasa de degradación de EGFR tras la estimulación con EGF en presencia de cicloheximida.

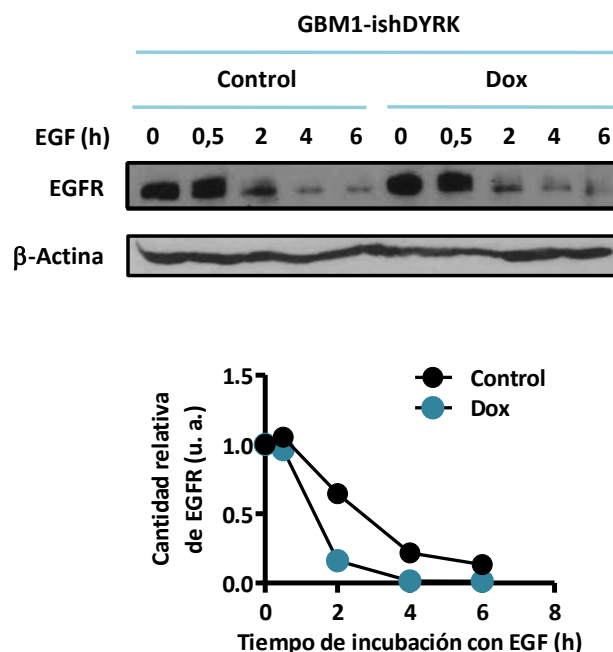


Figura R30. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A estimula la degradación de EGFR en las TICs de GBM. En la parte superior, análisis por WB de la degradación de EGFR en las células GBM1-*DYRK1A*sh, privadas de factores de crecimiento durante las 12 h previas, en presencia o ausencia de doxyciclina (Dox y Control, respectivamente) y a los tiempos indicados tras la estimulación con EGF (100 ng/mL). En la parte inferior, el gráfico muestra la cuantificación relativa de los niveles de EGFR respecto a los de β -Actina en cada punto temporal evaluado.

Además, se vio que el tratamiento con harmina de las TICs de GBM favorecía la finalización de la señalización de EGFR, aunque con ciertas variaciones que parecen depender del fondo genético de las líneas celulares. Así pues, la presencia de harmina afectaba a la cinética de fosforilación de AKT en la línea GBM1, mientras que en la línea *PTEN*-deficiente GBM5 se observó una alteración en la cinética de fosforilación de ERK pero no se observaron cambios evidentes en la activación de AKT (Figura R31).

En concordancia con estos resultados, se observó un claro incremento en la cantidad de EGFR dirigido a los lisosomas tras la estimulación con EGF en los cultivos tratados con harmina al ser comparados con los controles. Este análisis se realizó mediante la detección de los puntos de colocalización de EGF-Alexa488 y LysoTracker Red (Figura R32).

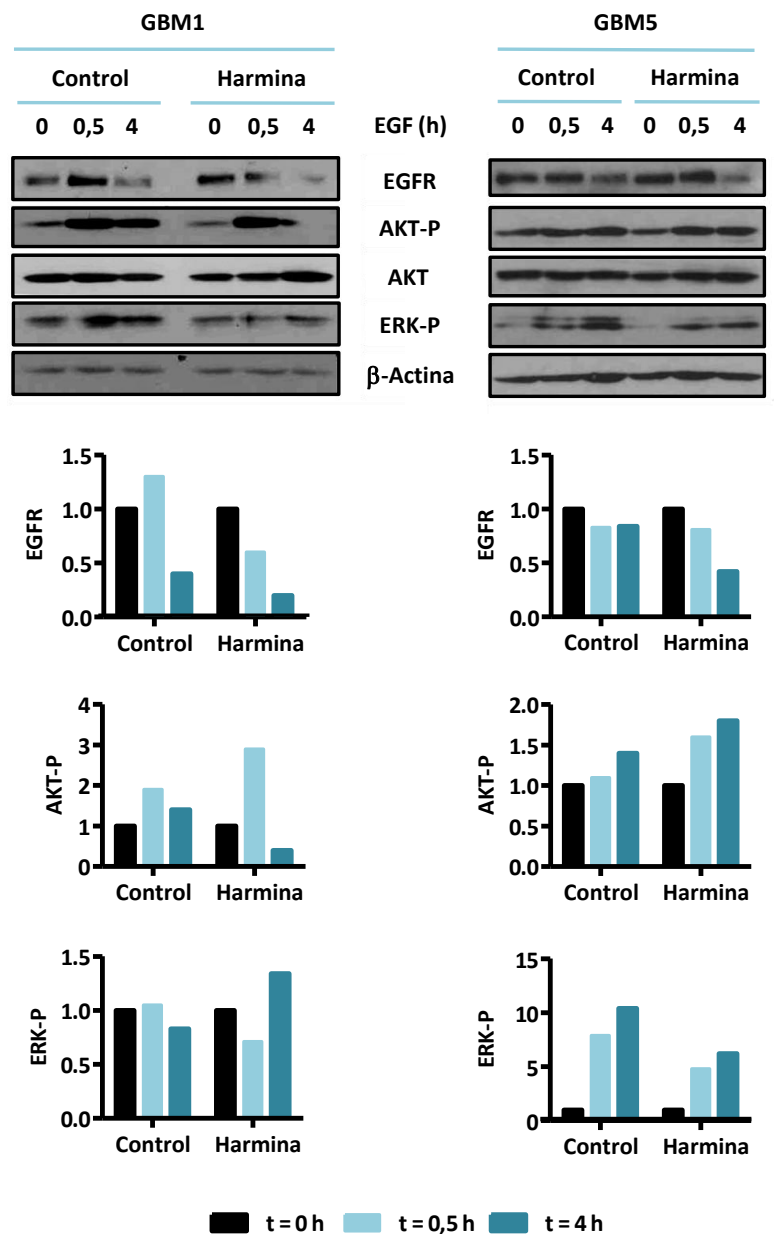


Figura R31. La inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A incrementa la degradación de EGFR y finaliza la señalización a través del receptor en las TICs de GBM. En la parte superior se muestra el análisis por WB de la vía de señalización de EGFR tras la estimulación con EGF (en los distintos tiempos evaluados en el ensayo) en las líneas de GBM1 y GBM5, en presencia y ausencia de harmina. En la parte inferior, los gráficos representan la cuantificación de los niveles relativos de EGFR, AKT-P y ERK-P respecto a los de β-Actina.

Estas observaciones indican que la inhibición de DYRK1A altera el balance entre degradación y reciclaje del receptor, lo que afecta a la duración de la señalización a través de EGFR. Asimismo, los datos sugieren que la cinética del recambio de EGFR determina el comportamiento de las TICs de GBM.

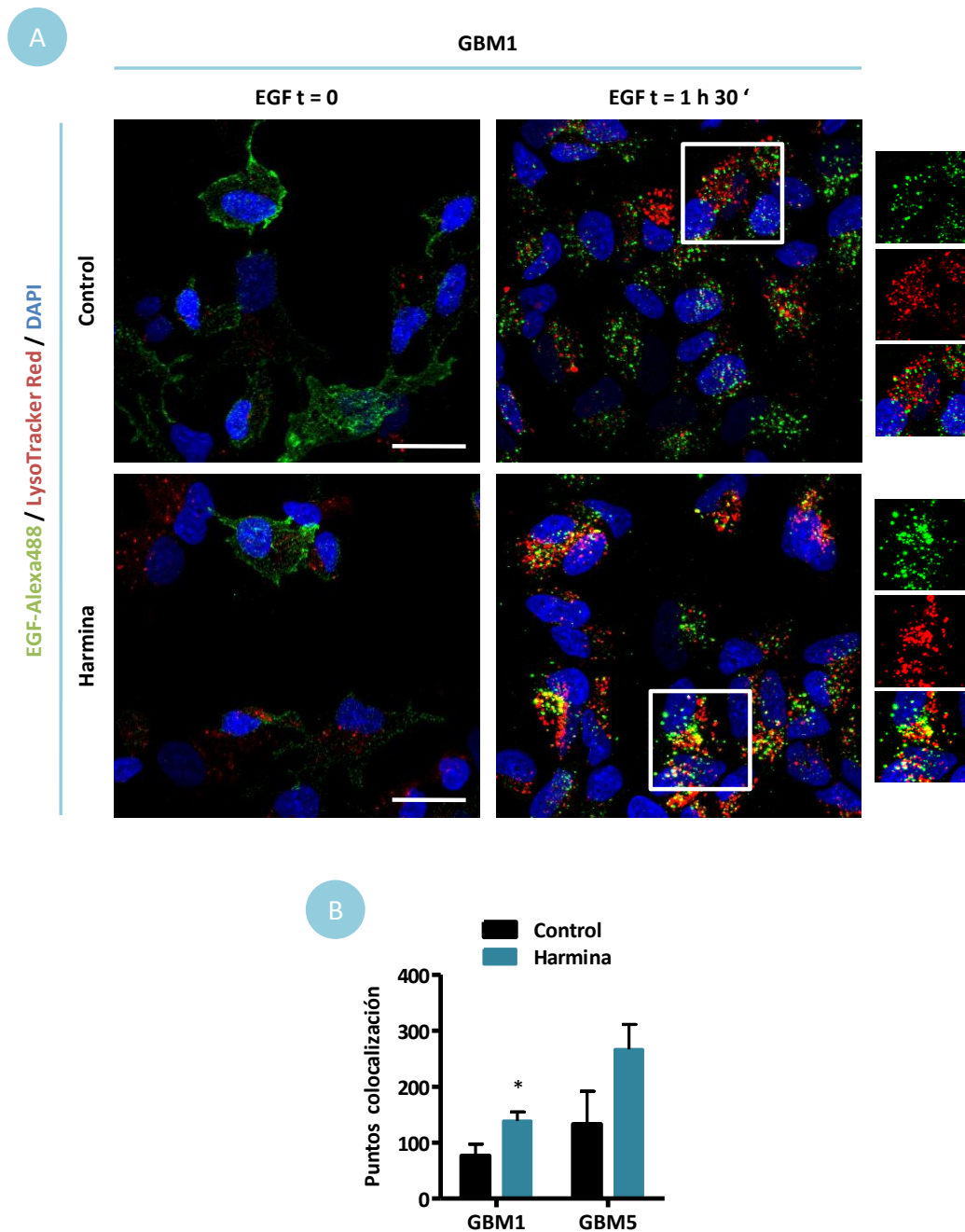


Figura R32. La inhibición de DYRK1A estimula la degradación lisosomal de EGFR en las TICs de GBM. Los cultivos de TICs de GBM fueron privados de factores de crecimiento durante 12 h y preincubados durante las últimas 4 h en presencia o ausencia de harmina. A continuación, se añadió al medio EGF-Alexa488 (100 ng/mL) y LysoTracker Red (50 nM) y las células fueron fijadas en los tiempos indicados. (A) Las imágenes de microscopía confocal muestran regiones representativas de la localización de EGFR (unido al ligando fluorescente) en los lisosomas en las células GBM4. (B) El gráfico representa la cuantificación de los puntos amarillos de colocalización de EGF-Alexa488 y LysoTracker Red presentes en GBM1 y GBM5. Barra de escala: 25 μ m. * $p \leq 0,05$

3.8 La sobreexpresión de SPRY2 revierte el efecto de la inhibición de DYRK1A sobre la estabilidad de EGFR y la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM

El mecanismo de acción por el cual DYRK1A regula la estabilidad de EGFR en las TICs de GBM parece ser similar al descrito para las NSCs de la SVZ de ratón. En estudios previos se había demostrado que Dyrk1A promueve la estabilidad de EGFR en las NSCs a través de la fosforilación de Spry2 (Ferron et al. 2010), una proteína que interviene en el reciclaje del receptor mediante el secuestro de la ligasa de ubiquitina Cbl (Cabrita and Christofori 2008).

Para determinar si en las TICs de GBM se producían efectos similares se sobreexpresó SPRY2 en la línea GBM5 (Figura R33A) y, a continuación, se evaluó su capacidad de formación de esferas secundarias y la estabilidad de EGFR tras la estimulación con EGF de los cultivos, previamente privados de factores de crecimiento (pero siempre en presencia de harmina). Los resultados mostraron una disminución del efecto de dicho inhibidor sobre la degradación de EGFR en las células con sobreexpresión de SPRY2 (Figura R33B), sugiriendo que DYRK1A ejerce su acción por encima de SPRY2.

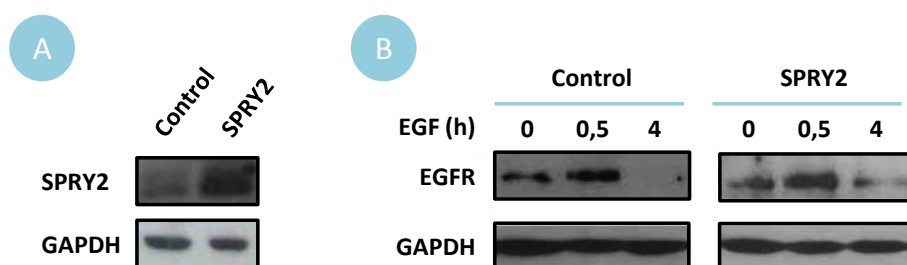


Figura R33. La sobreexpresión de SPRY2 revierte el efecto de la harmina sobre la degradación de EGFR en las TICs de GBM. (A) Las células de la línea GBM5 fueron infectadas con retrovirus para la sobreexpresión de SPRY2 o con el vector vacío (control). Transcurridas 48 h, se comprobó la sobreexpresión de SPRY2 mediante WB. (B) Las células GBM5 control o con sobreexpresión de SPRY2 fueron privadas de factores de crecimiento durante 12 h y, a continuación, se les añadió EGF en presencia de harmina en el medio durante los tiempos indicados. La imagen muestra los niveles de EGFR en las células, detectados mediante WB.

Además, se observó que la sobreexpresión de SPRY2 era capaz de revertir la supresión de la autorrenovación inducida por la harmina (Figura R34). Estos datos apoyan la hipótesis de que DYRK1A controla la autorrenovación de las TICs de GBM a través del mantenimiento de los niveles de EGFR en la membrana de las células e inhibiendo la finalización de la señalización a través del receptor.

Los resultados derivados del estudio del papel de DYRK1A en TICs de GBM, mediante la reducción de la expresión de la proteína o bien con la inhibición farmacológica de su actividad quinasas, indican que es una diana terapéutica efectiva para la disminución de la capacidad tumorigénica de dichas células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, nuestros resultados indican

que el efecto de la inhibición de DYRK1A en las TICs de GBM es debido principalmente a la regulación que ejerce sobre la estabilidad de EGFR y que esta se halla mediada por SPRY2.

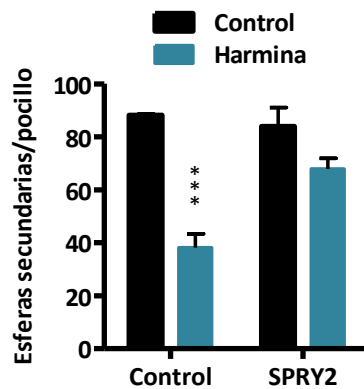
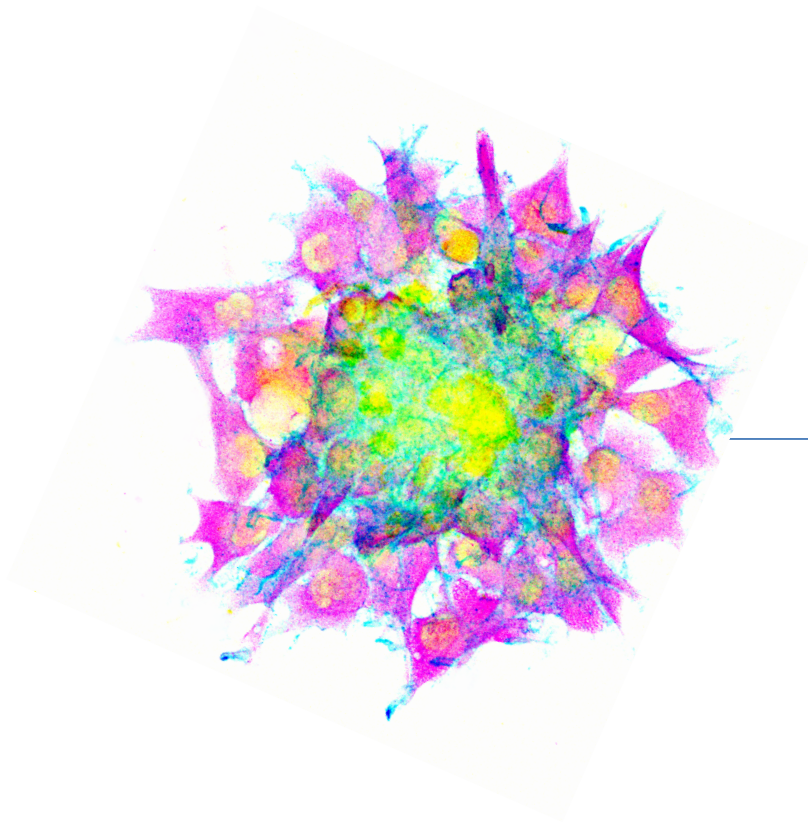


Figura R34. La sobreexpresión de SPRY2 revierte el efecto de la harmina sobre la capacidad de autorrenovación en las TICs de GBM. Transcurridas 24 h desde el momento de la infección retroviral para la sobreexpresión de SPRY2, las células se incubaron en presencia o ausencia de harmina durante 72 h. A continuación, las células fueron disociadas y sembradas a densidad clonal en ausencia de la droga. En el gráfico se representa en el número de células que fueron capaces de formar esferas secundarias. *** $p \leq 0,001$.



DISCUSIÓN

El trabajo experimental de la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de dos estrategias dirigidas a modular la actividad de EGFR en GBM: la inhibición de la actividad quinasa del receptor y la regulación de su estabilidad. Los GBMs son tumores muy agresivos y resistentes a QT y RT (Louis et al. 2007). El abordaje clínico estándar implica la resección quirúrgica del tumor seguida por la administración del agente alquilante TMZ, simultáneamente y después de la RT. Tras la recidiva del tumor no existe un tratamiento estándar y se administran fármacos como lomustina o el agente antiangiogénico bevacizumab en la segunda línea de tratamiento (Chamberlain 2010; Stupp et al. 2005). Sin embargo, la supervivencia de los pacientes no suele superar los 2 años desde el momento del diagnóstico. Entre las alteraciones genéticas más frecuentes en GBM se halla la amplificación de *EGFR* (34-63 % de los tumores primarios) y las mutaciones en el receptor, siendo la más común la variante *EGFRvIII* (en el 25-64 % de los GBMs), caracterizada por la delección de un fragmento del dominio EC (Gan et al. 2013). Por ello, las estrategias desarrolladas en los últimos años para el tratamiento del GBM se han centrado principalmente en la inhibición de la señalización a través de EGFR. Estas terapias, basadas en su mayoría en el uso de TKIs del receptor, no han proporcionado grandes beneficios en la supervivencia de los pacientes (Peereboom et al. 2010; van den Bent et al. 2009). Actualmente existen moléculas inhibitoras que han mostrado eficacia en distintas neoplasias dependientes de EGFR y cuya evaluación en modelos preclínicos de GBM sería necesaria para mejorar las perspectivas de éxito de los ensayos clínicos, comprender los mecanismos de resistencia farmacológica e identificar los marcadores de respuesta a dichas terapias.

En este contexto, es de gran importancia el mantenimiento de las características genéticas de las líneas de TICs de GBM empleadas para la evaluación de la efectividad de los nuevos fármacos antitumorales en los ensayos preclínicos. Se ha descrito la pérdida de la amplificación de *EGFR* y de la expresión de *EGFRvIII* en los cultivos de TICs de GBM al incrementar el número de pases *in vitro*. Sin embargo, dichas alteraciones moleculares pueden ser mantenidas mediante la expansión *in vivo* de las TICs de GBM (Humphrey et al. 1990; Pandita et al. 2004). En base a lo anterior, los ensayos *in vitro* descritos en la presente tesis se realizaron con cultivos primarios de bajo número de pases, garantizando la expresión de EGFR y *EGFRvIII* (cuando estuviese presente en el tumor original). Además, las líneas de TICs de GBM fueron mantenidas *in vivo* en forma de xenoinjertos subcutáneos para conservar las características originales del tumor humano y evitar la pérdida de expresión del receptor con los pases.

La evaluación de dos estrategias terapéuticas dirigidas contra EGFR en GBM ha proporcionado una serie de resultados que se dividen en dos capítulos para su mejor entendimiento. En el primer capítulo se exponen los resultados derivados de la inhibición de la actividad quinasa de EGFR con el fármaco dacomitinib y el estudio de su efecto sobre la

supervivencia, proliferación y capacidad de formación de tumores *in vivo* de distintas líneas primarias de TICs de GBM. En el segundo capítulo se muestran los resultados obtenidos a partir del estudio del papel de DYRK1A en el mantenimiento de la estabilidad de EGFR en las TICs de GBM y del efecto de la inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A sobre la capacidad de autorrenovación y de formación de tumores *in vivo* de distintas líneas celulares de GBM.

A continuación, se procederá a la discusión de los resultados previamente expuestos, organizándola entorno a los hallazgos más relevantes y/o controvertidos.

1. Relación entre la inhibición de EGFR y el estado de diferenciación de las células de GBM

La población constituida por las denominadas CSCs o TICs es resistente a los tratamientos convencionales de QT y RT, por lo que se considera responsable de la recurrencia de los GBMs (Beier et al. 2011). Las TICs de GBM expresan marcadores moleculares y poseen un comportamiento biológico similar a las NSCs. Estas propiedades están siendo utilizadas por numerosos grupos de investigación para diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la diferenciación de las células tumorales. Las principales moléculas que ejercen dicho efecto diferenciador son el ácido retinoico, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs, del inglés *Bone morphogenetic proteins*) y las drogas que alteran la epigenética del tumor, entre las que se hallan los inhibidores de la HDAC y los agentes hipometiladores (Aguado et al. 2007; Bots and Johnstone 2009; Massard et al. 2006; Piccirillo et al. 2006). Sin embargo, hasta la fecha todas estas moléculas han sido analizadas tan sólo a nivel preclínico.

Recientemente se ha descrito el efecto diferenciador de la inhibición de EGFR en cultivos de TICs de GBM, con la disminución de la expresión de genes relacionados con el fenotipo de célula madre (*Nestina*) y la inducción de marcadores asociados a tipos celulares más diferenciados (*GFAP*, *β III-Tubulina*) (Stockhausen et al. 2014). Otros grupos habían descrito previamente que la reducción de la expresión de EGFR en presencia de EGF conduce a una disminución de la capacidad de formación de neurosféricas *in vitro* de las TICs de GBM (Howard et al. 2010) e induce un fenotipo más diferenciado y menos maligno de los tumores *in vivo* (Mazzoleni et al. 2010). En concordancia con ellos, nuestros datos indican que los tumores tratados con dacomitinib experimentan una disminución de la expresión de los marcadores moleculares de célula madre (*Nanog*, *CD133*, *ID1*, *Nestina*) a nivel de ARNm, así como de las citocinas *LIF* e *IL-11*, que se asocian con el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de dichas células (Bauer and Patterson 2006; Penuelas et al. 2009; Peterson et al. 2013). Esto sugiere que EGFR podría estar implicado en la regulación y el mantenimiento del estado indiferenciado de las TICs de GBM de forma paracrina. Esta hipótesis se podría correlacionar con la distribución irregular de la amplificación de

EGFR y de la expresión de *EGFRvIII* dentro de un mismo GBM (Greenall et al. 2014) así como con las observaciones que sugieren la regulación parcial de la capacidad tumorigénica de *EGFR* mediante la secreción de citocinas (Inda et al. 2010) que favorecerían la autorrenovación del resto de células del tumor.

Por otro lado, el crecimiento exponencial de los tumores se recupera al retirar el tratamiento, sugiriendo que la pérdida del potencial tumorigénico inducida por dacomitinib en las TICs de GBM es específica y reversible. Esto podría estar relacionado con la ausencia de un incremento consistente de la expresión de marcadores de diferenciación neural terminal (*GFAP δ* , *GFAP α* , *CSP*, *β III Tub* y *GIRDN*) en los tumores tratados con el inhibidor de *EGFR*. Otra posible explicación sería la heterogeneidad intratumoral, es decir, que no todas las células del tumor dependan de *EGFR* de la misma manera. Se trataría de un contexto biológico en el que coexistirían diferentes subpoblaciones de TICs, con distinta capacidad tumorigénica, fenotipo y características moleculares. De hecho, se sabe que existe una expresión altamente heterogénea del receptor en cada tumor, incluso en aquellos que presentan la amplificación del gen (Szerlip et al. 2012). Si esta hipótesis fuera correcta, la inhibición de *EGFR* en la población de TICs *EGFR*-positivas (dependientes del receptor para su supervivencia y el mantenimiento de su capacidad tumorigénica) no sería suficiente para compensar la falta de respuesta de la población sin expresión de *EGFR* dentro del mismo tumor. Dichas células *EGFR*-negativas sobrevivirían al tratamiento, siendo capaces de repoblar el tumor y dar lugar a la recidiva del mismo. Esto estaría de acuerdo con los datos de otros grupos que indican que la subpoblación *EGFR*-negativa (identificada y aislada por citometría de flujo) también es capaz de generar tumores cuando se implanta en ratones inmunodeprimidos, aunque el fenotipo tumoral sea diferente al de los tumores generados por la subpoblación *EGFR*-positiva (Mazzoleni et al. 2010). Además, se ha descrito recientemente que las células de GBM son capaces de modular la expresión de *EGFRvIII* de manera reversible en respuesta al tratamiento con TKIs. Así pues, las células tumorales eliminarían la variante *EGFRvIII* en forma de ADN extracromosómico durante el tratamiento con los inhibidores, pudiéndolo reincorporar después para restablecer su expresión y promover la resistencia a las terapias centradas en *EGFR* (Nathanson et al. 2014).

También se ha postulado la generación de la heterogeneidad celular intratumoral en GBM como consecuencia de la propia expresión de *EGFR*. La secreción de EGF por las células estromales del tumor desencadena la señalización a través del receptor, su internalización y degradación en las células *EGFR*-positivas, dando lugar a una población de TICs *EGFR*-negativas (Hynes and MacDonald 2009). Este proceso, favorecido por una estimulación excesiva del ligando durante la progresión tumoral, desencadenaría la activación de mecanismos compensatorios y la

señalización a través de rutas alternativa y podría ser uno de los responsables la heterogeneidad tisular de los GBMs y de la resistencia a los inhibidores de EGFR.

2. Efecto de dacomitinib en presencia de la isoforma EGFRvIII y/o de mutaciones en *PTEN*

Hasta el momento, los datos preclínicos sobre el efecto de dacomitinib en gliomas son bastante limitados y describen su capacidad para inhibir la fosforilación de EGFR y reducir la viabilidad de diversas líneas celulares primarias de GBM (derivadas de pacientes y establecidas) (Zhu and Shah 2014). Sin embargo, nuestros resultados demuestran la notable eficacia de la administración de dacomitinib *in vivo*, con una sorprendente reducción de la tasa de crecimiento tumoral. De hecho, los tumores tratados con dacomitinib presentaban un tamaño significativamente inferior al de los controles (tratados con lactato) al finalizar la administración del tratamiento. Además, dicho efecto era común para todos los xenoinjertos generados tras la inyección de TICs de GBM con amplificación de *EGFR*, con independencia de la presencia de EGFRvIII. La expresión del receptor mutante en las células de GBM se había postulado como uno de los mecanismos de resistencia a gefitinib y cetuximab, siendo necesaria una exposición prolongada a cantidades superiores de la droga para lograr la inhibición de la señalización del receptor (Learn et al. 2004; Pedersen et al. 2005; Wheeler et al. 2010). Este mismo mecanismo de resistencia se ha descrito recientemente al sobreexpresar EGFRvIII en líneas celulares de GBM para evaluar el efecto de dacomitinib *in vitro* (Zhu and Shah 2014). En contraposición a lo anterior, nuestros resultados demuestran que el inhibidor tiene un efecto similar sobre la viabilidad, autorrenovación y proliferación en los tumores con amplificación de *EGFR*, con o sin la forma mutante EGFRvIII. Además, el análisis de las vías de señalización de EGFR muestra una disminución de la activación (fosforilación) de AKT, MAPK y S6 en todas las líneas sensibles al tratamiento, sin excluir la principal vía de señalización activada por EGFRvIII: la de PI3K/AKT. No obstante, nuestros resultados estarían de acuerdo aquellos que afirman que la expresión de EGFRvIII (en un contexto con *PTEN* salvaje), no sólo no inhibe, sino que sensibiliza al tratamiento con TKIs de EGFR en pacientes con GBM recurrente (Mellinghoff et al. 2005). Además, en el caso particular de dacomitinib, se ha visto que la presencia de determinadas mutaciones en el dominio EC de EGFR (entre las que se halla EGFRvIII) correlacionan con una mejor respuesta al inhibidor en la línea celular U87 (Greenall et al. 2014).

La inhibición de la señalización de las vías activadas por EGFR que hemos observado en los tumores tratados con dacomitinib es análoga a la descrita por Zhu, Y. y colaboradores en los ensayos *in vitro* realizados con líneas establecidas y cultivos primarios de TICs de GBM (Zhu and Shah 2014). Estos autores han postulado que dacomitinib es inefectivo en células deficientes en

PTEN funcional y con AKT constitutivamente activo (Zhu and Shah 2014). De manera similar, el tratamiento con dacomitinib de los tumores generados por la línea GBM5 (con amplificación de *EGFR* y *PTEN* deleciónado) inhibía la fosforilación de EGFR pero no la señalización a través de AKT, ERK y S6. Esto se traduce en un efecto limitado de dacomitinib sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, inferior al que ejerce sobre las líneas con *EGFR* amplificado y PTEN funcional. Paradójicamente, la ausencia de PTEN no alteró el efecto de dacomitinib *in vitro*, sugiriendo la existencia de señales adicionales *in vivo* que son capaces de compensar la inhibición de la actividad quinasa de EGFR en dicho contexto celular. Estudios previos han mostrado que PTEN es capaz de modular la actividad de mTOR, PI3K, la estabilidad de EGFR y su fosforilación (Sos et al. 2009; Vivanco et al. 2010), y que los elevados niveles basales de AKT-P que induce pueden ser los responsables de falta de respuesta a los inhibidores de EGFR en determinados tumores. De hecho, los pacientes portadores de tumores con la forma salvaje de PTEN o con niveles bajos de AKT-P responden mejor al tratamiento dirigido contra EGFR (Haas-Kogan et al. 2005; Mellingerhoff et al. 2005). Así pues, al restaurar la expresión de PTEN en una línea celular deficiente, se incrementa la respuesta a los TKIs de EGFR y se induce muerte celular por apoptosis (Bianco et al. 2003). Asimismo, se ha descrito la modulación de la actividad de PTEN por las SFKs y FGFR (del inglés Fibroblast growth factor receptor) mediante la fosforilación de residuos tirosina. En particular, la del residuo Y240 por FGFR se ha relacionado con la resistencia a los inhibidores de EGFR y la supervivencia reducida en pacientes con GBM (Fenton et al. 2012). Por otro lado, se ha postulado que la expresión de la forma mutante EGFRvIII (entre otras mutaciones del dominio EC de EGFR) en un contexto *PTEN*-deleciónado (la línea celular U87) es capaz de sensibilizar las células a la acción de dacomitinib, sin observarse este efecto cuando la línea celular tan solo expresa el receptor salvaje (Greenall et al. 2014). Esto sugiere que la ausencia de PTEN no sería tan relevante en presencia de la isoforma VIII. En cualquier caso, todo lo anterior indica que la caracterización del estado de *EGFR* y de *PTEN* en las muestras de GBM es de gran interés para predecir la respuesta de los tumores a dacomitinib, entre otros TKIs de EGFR. De hecho, el análisis de los niveles basales de AKT-P ha sido propuesto como marcador predictivo de respuesta a erlotinib en GBM (Haas-Kogan et al. 2005). En este contexto, también resultaría interesante el uso combinado de los inhibidores de EGFR y de la vía de PI3K/mTOR, con los que se ha observado un efecto antitumoral sinérgico sobre líneas celulares de glioma (Zhu and Shah 2014).

3. Bloqueo de la señalización mediada por EGFR en respuesta a dacomitinib *in vivo*

Nuestros resultados confirman la inhibición de la fosforilación de EGFR y la inducción de muerte celular por apoptosis tras el tratamiento con el inhibidor de los xenoinjertos subcutáneos

e intracraneales, demostrando la capacidad del inhibidor para atravesar la barrera hematoencefálica y difundir al cerebro, con el consiguiente incremento en la supervivencia de los animales. Asimismo, se observó la inhibición consistente de AKT-P, ERK-P y S6-P en los tumores subcutáneos tratados durante 5 días con dacomitinib (tratamiento corto). Es la primera vez que se obtienen estos resultados con un inhibidor de EGFR, a diferencia de los resultados descritos por Hegi, M.E. y colaboradores en muestras de GBM procedentes de pacientes tratados con gefitinib (ensayo clínico fase I) y en tumores subcutáneos en modelos preclínicos. En este caso, el tratamiento corto (5 días) con gefitinib no proporcionó efectos sobre la activación de las moléculas efectoras de la vía de EGFR (Hegi et al. 2011). La mayor eficacia de dacomitinib podría explicarse, entre otros factores, por su unión irreversible a EGFR, a diferencia de gefitinib que es un inhibidor reversible de primera generación.

La inhibición de la fosforilación de EGFR y de sus principales efectores moleculares tras la administración de dacomitinib durante 4 semanas (tratamiento largo) se tradujo en el bloqueo del crecimiento de los tumores con amplificación de *EGFR* y PTEN funcional y un volumen tumoral reducido, en comparación con los controles, al finalizar el tratamiento. Esto podría estar relacionado con cambios en el estroma tumoral, ya que en los tumores control se observan grandes áreas de necrosis e inflamación. También es posible que las moléculas analizadas se hallaran activadas debido a la señalización de otros RTKs que confluyen en la activación de los mismos efectores moleculares. Estos receptores podrían estar ya amplificados y/o activados en las células tumorales, o bien podrían activarse en respuesta a la inhibición de EGFR, como se ha descrito para PDGFR (Akhavan et al. 2013). Por ello, sería necesaria la detección de alteraciones genéticas en otros RTKs (más allá de las presentes en *EGFR*) en las células tumorales, que podrían contribuir a la resistencia al tratamiento con inhibidores del receptor. Esto permitiría el diseño de terapias personalizadas según las características moleculares del tumor que presenta cada paciente y basadas en la combinación de diversos inhibidores.

En los tumores tratados con dacomitinib se observó una inhibición muy consistente de la proteína ribosomal S6, implicada en la regulación del tamaño celular, la proliferación y la homeostasis de glucosa. En este punto, cabe mencionar la relevancia de la relación existente entre EGFR y el metabolismo celular en los GBMs, con un peor pronóstico en presencia de grandes áreas de necrosis y de hipoxia (Barker et al. 1996). De hecho, se ha descrito que los inhibidores de EGFR podrían tener un efecto protector contra la apoptosis inducida por hipoxia aguda mediante la reducción del consumo de glucosa, el retraso del agotamiento del ATP y el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial a través de la defosforilación de la proteína ribosomal S6, y que se opondría al efecto proapoptótico de los inhibidores en condiciones de normoxia (Steinbach et al. 2004). Es decir, que la inhibición de EGFR simularía la

deprivación de nutrientes, preparando las células para las condiciones de bajo oxígeno y ayuno (Steinbach et al. 2004). Por tanto, los inhibidores de EGFR podrían resultar contraproducentes en un contexto de elevada necrosis, algo que no ocurre en los xenoinjertos cuando se inicia el tratamiento con dacomitinib. Sería interesante, por tanto, el análisis de la posible correlación entre los marcadores de hipoxia/necrosis y la respuesta a los inhibidores de EGFR en los pacientes con GBM.

4. La inhibición de la estabilidad de EGFR tiene un efecto antitumoral en GBMs

La gran importancia de la señalización a través de EGFR en GBM se refleja en la frecuente amplificación génica del receptor y la presencia de mutaciones que dan lugar a variantes constitutivamente activas (como EGFRvIII) (Frederick et al. 2000). No obstante, el fallo de las terapias dirigidas contra EGFR en GBM, principalmente basadas en el uso de TKIs, hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas capaces de bloquear su señalización de manera eficiente y reducir el crecimiento de aquellos tumores dependientes del receptor. Los datos preclínicos que hemos obtenido durante la evaluación del efecto de dacomitinib sobre las TICs de GBM generan grandes expectativas por su efectividad en el bloqueo de la señalización a través de EGFR y la consiguiente reducción del crecimiento tumoral *in vivo*. Sin embargo, nuestros resultados indican también que su efecto es reversible y que los tumores vuelven a crecer cuando se retira el tratamiento. Además, más allá de la inhibición de la cascada de señalización inducida por EGFR, también se observa la acumulación del receptor en presencia de dacomitinib. Esto estaría de acuerdo con los datos de otros autores que indican que dacomitinib es capaz de inducir la formación de un dímero inactivo de EGFR que, aunque no responde a la estimulación por ligando, se acumula en el citosol celular (Greenall et al. 2014). De este modo, el receptor podría seguir realizando funciones independientes de su actividad quinasa (Figura I3), asociadas con la supervivencia y crecimiento de las células tumorales (Han and Lo 2012).

En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas dirigidas a reducir los niveles de EGFR, para su uso en exclusividad (monoterapias) o en combinación con los inhibidores de la actividad quinasa del receptor (terapias combinadas). Entre ellas se hallan los ARNs de interferencia (ARNi) dirigidos a inhibir la expresión de EGFR salvaje o de sus variantes mutantes. Este método ha mostrado ser eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral de células de GBM en ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* (Kang et al. 2006; Mazzoleni et al. 2010; Verreault et al. 2013), sin embargo, la ausencia de mecanismos eficientes para la distribución del ARNi a nivel sistémico dificulta su aplicación inmediata en la clínica.

Más allá de la acción directa sobre la regulación de la expresión de EGFR, se han ideado otras estrategias que permiten reducir los niveles de receptor de manera indirecta, actuando sobre moléculas reguladoras de la estabilidad del receptor. En la Figura D1 se ilustra el proceso de internalización de EGFR desde la membrana celular y su posterior tráfico intracelular que implica alguno de los siguientes procesos: la degradación lisosomal, la translocación al núcleo o el reciclaje a la superficie celular. Además, se representan las principales moléculas que participan en estos procesos, entre las que destacan LRIG1 y MIG-6 (que favorecen la internalización y la degradación de EGFR) y SPRY2 (que estabiliza el receptor en la membrana celular e impide su degradación), la expresión de las cuales es inducida por la señalización a través del propio EGFR (Avraham and Yarden 2011).

En primer lugar, LRIG-1 es una glicoproteína transmembrana capaz de limitar la señalización a través de EGFR mediante el reclutamiento de CBL para su interacción con el receptor (Gur et al. 2004; Laederich et al. 2004) e implicada en la degradación de EGFRvIII en células de GBM (por una vía independiente de CBL) (Stutz et al. 2008), por lo que se considera supresora tumoral. La sobreexpresión de LRIG1 en células de glioma reduce los niveles de EGFR en la superficie celular (independientemente de su estado de activación), inhibe el crecimiento y la invasión celular, e induce apoptosis *in vitro*. Asimismo, se ha descrito el aumento del ratio EGFR/LRIG1 en gliomas, en comparación con el tejido cerebral normal, sugiriendo una relación entre la reducción de los niveles de LRIG1 y la progresión tumoral (Johansson et al. 2013; Ye et al. 2009). En esta misma línea, el ácido gambógico es capaz de activar AMPK (del inglés *AMP-Activated Protein Kinase*) y de incrementar los niveles de LRIG1, favoreciendo la inhibición de la señalización a través de EGFR, el incremento de la apoptosis y el bloqueo del crecimiento tumoral de las células de GBM (He et al. 2013). Sin embargo, recientemente se ha observado que la forma soluble de LRIG1 (sLRIG1) ejerce un efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* promoviendo la parada del ciclo celular y disminuyendo los niveles de ERK-P, sin alterar los niveles y la activación de EGFR (Johansson et al. 2013). De hecho, sLRIG1 podría estar actuando a través de otros RTKs o con independencia de ellos, convirtiéndola en un potencial agente antitumoral con una actividad inhibidora más general e independiente de EGFR.

En segundo lugar, la proteína MIG-6 es reclutada hacia EGFR activado y favorece el tráfico del receptor hacia los endosomas tardíos para su degradación (Ying et al. 2010). En concordancia, se ha hallado EGFR hiperactivado en los ratones KO para *Mig-6*, lo que provoca la hiperproliferación y el bloqueo de la diferenciación de los queratinocitos de la epidermis (Ferby et al. 2006). Por otro lado, los análisis masivos de expresión realizados en GBM han identificado la presencia de una delección focal en 1p36, región en la que se halla codificado *MIG-6* (en el 13 % de los GBMs) y la reducción de la expresión de MIG-6 en la mitad de los tumores analizados.

Asimismo, se ha observado una correlación positiva entre la presencia de alteraciones genómicas en *MIG-6* y de *EGFR* amplificado y/o de *EGFRvIII* en las muestras de GBM (Ying et al. 2010). Estos resultados sugieren el papel de *MIG-6* como supresor tumoral en GBMs, especialmente en aquellos tumores dependientes de *EGFR*.

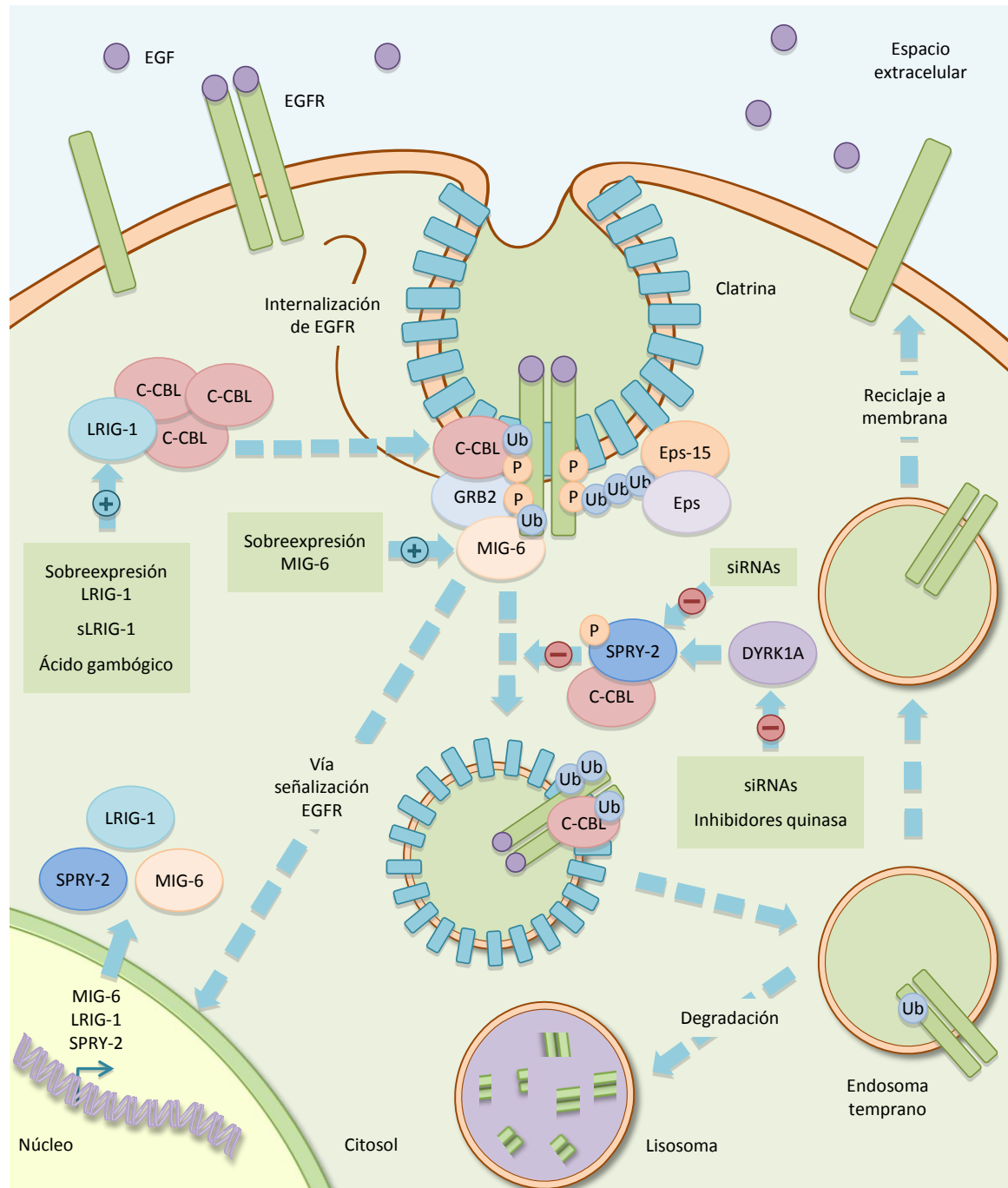


Figura D1. Regulación del recambio de EGFR. La internalización de EGFR mediante endocitosis mediada por clatrina implica a una gran diversidad de proteínas y tiene como resultado la degradación del receptor en los lisosomas o su reciclaje a la membrana celular. La activación de EGFR por interacción con ligando induce la expresión génica de *LRIG1*, *MIG-6* y *SPRY-2*, moléculas implicadas en la regulación del recambio del receptor. Las cajas de color verde de la imagen muestran las estrategias dirigidas a alterar la estabilidad de EGFR mediante la activación o inhibición de las distintas moléculas reguladoras de la internalización y el tráfico intracelular del receptor.

En tercer lugar, la fosforilación de SPRY-2 en el residuo tirosina Y55 actúa como sitio de anclaje para el dominio SH2 de CBL y compite con el residuo tirosina Y1045 fosforilado de EGFR. De este modo, SPRY-2 secuestra las moléculas de CBL unidas al receptor activado y bloquea la ubiquitinación, endocitosis y degradación de EGFR mediada por CBL, favoreciendo la señalización mantenida a través del receptor (Egan et al. 2002; Rubin et al. 2003). A pesar de que SPRY-2 es considerada una proteína supresora de tumores en distintos tipos de neoplasias, es capaz de promover la formación de otros tumores como el cáncer de colon (Barbachano et al. 2010). En gliomas se han asociado diversos miembros de la familia de SPRY con la regulación de la señalización de EGFR (Ivliev et al. 2010), sugiriendo que podrían actuar como oncogenes en los tumores dependientes del receptor.

5. La inhibición de DYRK1A provoca una mayor degradación de EGFR y un menor crecimiento tumoral

Los resultados bioquímicos presentados en este trabajo sugieren que DYRK1A es un regulador de la actividad de SPRY-2 y también un modulador la degradación lisosomal de EGFR en las TICs de GBM, en consonancia con lo descrito previamente para las NSCs de ratón (Ferron et al. 2010). Según el modelo propuesto (ilustrado en la Figura D1), DYRK1A interacciona con SPRY2 y la fosforila en el residuo treonina T75, lo que favorecería su activación y unión a CBL. Este secuestro de CBL estaría impidiendo la degradación lisosomal de EGFR. De este modo, la actividad de DYRK1A estabilizaría al receptor e impulsaría el incremento, o el mantenimiento, de la señalización a través del mismo. En este contexto, DYRK1A representa una diana más sugerente que las citadas en el apartado anterior, ya que es más sencillo actuar sobre la actividad quinasa de una proteína mediante el uso de inhibidores que modular la expresión de una determinada molécula reguladora (silenciándola o sobreexpresándola), desde el punto de vista de la administración y distribución sistémica de la terapia. De hecho, los resultados descritos en este trabajo confirman que moléculas como harmina (Bain et al. 2007) favorecen la degradación lisosomal de EGFR, disminuyendo su estabilidad en la membrana celular. Como consecuencia, se produce la disminución de la capacidad de autorrenovación de las TICs de GBM *in vitro* y la inhibición de su capacidad tumorigénica *in vivo*. Es interesante destacar que el efecto en autorrenovación se reproduce en presencia de otro inhibidor no relacionado, INDY (Ogawa et al., 2010), lo que refuerza el papel de DYRK1A en las células de gliomas. Con anterioridad, se había descrito el incremento de la apoptosis y la disminución de los niveles de AKT-P al tratar las células de GBM con harmina en ensayos *in vitro* (Liu et al. 2013). Sin embargo, la inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A no se había relacionado con la regulación de EGFR en las TICs de GBM hasta el momento.

Nuestros resultados sugieren que el efecto de la inhibición de DYRK1A en las TICs de GBM es irreversible, dado que las células no recuperan su capacidad de autorrenovación al retirar la harmina o el inductor de la expresión de *DYRK1A^{sh}* del medio de cultivo. Sin embargo, nuestros datos no nos permiten concluir si el efecto terapéutico de la inhibición de DYRK1A es irreversible *in vivo*. Para ello, sería necesario realizar ensayos en los que se observara el crecimiento tumoral tras revertir la inhibición génica o tras retirar el tratamiento farmacológico. Estos ensayos serían de gran importancia para determinar la eficacia terapéutica de la inhibición de DYRK1A en GBMs y también para poder hacer una comparación con la inhibición del propio EGFR en presencia de dacomitinib. En cualquier caso, es necesario el desarrollo de nuevos inhibidores con una mayor especificidad sobre DYRK1A y con propiedades farmacológicas mejoradas respecto a INDY, que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Ogawa et al. 2010), y a la harmina, que provoca alteraciones neurológicas a dosis elevadas (Coates and Cox 1972; Guan et al. 2001; Lutes et al. 1988) debido a la inhibición de la MAO-A (Kim et al. 1997; Glennon et al. 2000), los receptores de imidazolininas (Husbands et al. 2001) y las CDKs (Song et al. 2004). En la actualidad la búsqueda de nuevos inhibidores de DYRK1A resulta de gran interés para el tratamiento de las disfunciones neurológicas asociadas a las enfermedades neurodegenerativas (incluyendo la enfermedad de Alzheimer) y al DS. Se busca que sean moléculas con una elevada selectividad, de bajo peso molecular y capaces de difundir de forma pasiva a través de la barrera hematoencefálica (Becker et al. 2014; Smith et al. 2012), lo cual supondría también una ventaja en sus posibles aplicaciones en el tratamiento de los pacientes con GBM.

6. La inhibición de DYRK1A podría estar modulando otras vías de señalización independientes de EGFR

A pesar del efecto observado sobre EGFR, no podemos descartar que DYRK1A esté realizando otras funciones en las TICs de GBM. De hecho, recientemente se ha descrito la inducción de apoptosis en células de GBM mediante el tratamiento con harmina, detectándose incrementos en los niveles de Bax y Caspasa-3 activada (proapoptóticas) y la disminución de BCL-2 y BCL-xl (con actividad antiapoptótica) (Liu et al. 2013). Asimismo, no se puede descartar un efecto paracrino de DYRK1A en los tumores, ni su implicación en la angiogénesis, ya que se ha descrito su capacidad de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la regulación de factores angiogénicos y citocinas inflamatorias (Hamsa and Kuttan 2010). No obstante, se requieren estudios adicionales para determinar cuál es el papel de DYRK1A en la apoptosis y la formación de vasos sanguíneos en los tumores gliales y si estas respuestas están relacionadas también con la estabilización de EGFR. De hecho, DYRK1A es capaz de fosforilar y activar numerosas proteínas que favorecen la supervivencia celular o promueven la apoptosis, relacionadas con la carcinogénesis de distintos tejidos. Una de ellas es el factor de transcripción

STAT3, cuya fosforilación y activación dependen, entre otras quinasas, de DYRK1A (Matsuo et al., 2001). En las células normales la activación de STAT3 es transitoria, mientras que en una gran diversidad de neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas y mielomas múltiples) y de tumores sólidos (cáncer de cabeza y cuello, mama, pulmón, gástrico, hepático, colorrectal, cerebral y de próstata) se halla constitutivamente activa (Siveen et al. 2014). Existen grandes evidencias de que la señalización alterada de STAT3 promueve el inicio y la progresión tumoral mediante la inhibición de la apoptosis y la inducción de la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Kamran et al. 2013). En cuanto a su regulación, la fosforilación de STAT3 por JAK (del inglés *Janus Kinase*) en la tirosina Y705 induce su dimerización y translocación al núcleo, mientras que la fosforilación en la serina S727 por DYRK1A es necesaria para alcanzar una actividad transcripcional máxima (Matsuo et al. 2001; Wen et al. 1995). De hecho, datos recientes sugieren que la fosforilación en S727 tiene un papel fundamental en la regulación de la translocación nuclear de STAT3 y de la supervivencia celular (Sakaguchi et al. 2012). Sin embargo, aún no se ha estudiado la inhibición de DYRK1A como modulador del crecimiento de los tumores dependientes de STAT3. Otro factor de transcripción regulado por DYRK1A es GLI1, el principal efector de la vía de señalización de SHH (del inglés *Sonic hedgehog*). La actividad de DYRK1A parece favorecer la translocación nuclear de GLI1 (Mao et al. 2002), permitiendo la señalización SHH-GLI1 y la consiguiente regulación del crecimiento, la supervivencia tumoral y la metástasis en una amplia variedad de tumores (Altaba 2011). No obstante, la relevancia de la fosforilación de GLI1 por dicha DYRK1A y las posibles aplicaciones de sus inhibidores en el tratamiento de tumores dependientes de SHH está aún en debate.

Por otro lado, la función de DYRK1A se ha asociado a la regulación negativa de la vía de apoptosis intrínseca, mediante la fosforilación de la Caspasa-9 en el residuo treonina T125 (Laguna et al. 2008; Seifert et al. 2008). Por ello, se podría emplear la inhibición de DYRK1A para favorecer la respuesta de las células tumorales a la QT mediante la activación de Caspasa-9. Además, DYRK1A es capaz de promover la supervivencia celular a través de la fosforilación y activación de SIRT1 (Sirtuin 1), una deacetilasa dependiente de NAD que participa en la respuesta a estrés y en el metabolismo celular (Imai and Guarente 2014). Se ha descrito la fosforilación directa de SIRT1 por parte de DYRK1A en la treonina T522, lo que promovería la deacetilación de P53. Por el contrario, la inhibición de DYRK1A sensibilizaría las células a la muerte celular inducida por daño en el ADN (Guo et al. 2010). Asimismo, la inhibición de esta quinasa bloquea la quiescencia (mediante la inhibición del complejo DREAM) y promueve la apoptosis (a través de la vía de señalización Hippo), convirtiendo a DYRK1A en una diana terapéutica adecuada para incrementar la muerte celular en respuesta a RT y QT en distintos tipos de neoplasias, tal y como ya han sugerido otros autores (Ionescu et al. 2012).

7. El papel de DYRK1A en cáncer

El papel de DYRK1A en cáncer se ha estudiado principalmente entre los individuos con DS, que presentan un riesgo incrementado de padecer leucemias, asociadas a mutaciones en *GATA1* (del inglés *Globin transcription factor 1*) (Hitzler et al. 2003;Hollanda et al. 2006;Taub et al. 2004;Wechsler et al. 2002). La presencia de estas mutaciones en individuos sin DS no predispone a padecer leucemia; sin embargo, la trisomía de la región cromosómica DSCR (que incluye DYRK1A) provoca el incremento de la proliferación de megacariocitos y es suficiente para cooperar con las mutaciones en *GATA1* y favorecer la aparición de tumores, reforzando el papel prooncogénico de DYRK1A en este tipo de células. En oposición a lo anterior, los individuos con DS presentan una notable reducción de la incidencia de la mayoría de tumores sólidos (Hasle et al. 2000;Nizetic and Groet 2012). De hecho, la sobreexpresión de DYRK1A (en cooperación con el gen DSCR1) es capaz de disminuir la angiogénesis mediante la atenuación de la señalización a través de VEGF-calcineurina-NFAT (del inglés *Nuclear factor of activated T-cells*) en las células endoteliales (Arron et al. 2006;Baek et al. 2009). Las proteínas NFAT son factores de transcripción que se activan, se translocan al núcleo y promueven la expresión génica en respuesta a un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Mancini and Toker 2009;Shaw et al. 1988). En general, la activación de la vía de señalización de las NFATs se considera un proceso protumorigénico que incrementa la proliferación y la supervivencia celular (en las neoplasias linfoides de células T), favorece la diseminación metastásica (en las neoplasias epiteliales) y promover la angiogénesis (Mancini and Toker 2009;Muller and Rao 2010;Shaw et al. 1988). En este contexto, DYRK1A fosforila a NFAT y la prepara para la posterior fosforilación por CK1 y GSK3, conduciendo a la inactivación y exportación nuclear de NFAT (Beals et al. 1997;Okamura et al. 2004;Zhu et al. 1998). Por tanto, dado que VEGF es una de las dianas identificadas de NFAT, cabría esperar que la sobreexpresión de DYRK1A contribuyese a la baja incidencia de tumores sólidos adultos en los individuos con DS (Baek et al. 2009). No obstante, se debe tener en consideración que el DS es un síndrome multifactorial caracterizado por la sobreexpresión de diversos genes, que podrían estar implicados en la predisposición reducida al cáncer. Paradójicamente, se ha propuesto que la contribución de DYRK1A a las neoplasias megacariocíticas está mediada también a través de la inhibición de NFAT, aunque no se descarta la implicación de otros sustratos de la quinasa en el proceso (Malinge et al. 2012). Así pues, mientras que DYRK1A y NFAT parecen suprimir el crecimiento de tumores epiteliales y linfoides en el adulto, pueden actuar como oncogenes en los tumores megacariocíticos infantiles. Estas funciones opuestas de NFAT, dependientes del contexto celular, son semejantes a las de otros sustratos de DYRK1A. Este es el caso de NOTCH, fosforilada e inhibida por DYRK1A (Fernandez-Martinez et al. 2009;Hammerle et

al. 2011), y cuya activación incrementada se ha relacionado clásicamente con procesos oncogénicos (en tumores sólidos y neoplasias sanguíneas). Sin embargo, recientemente se ha descrito el papel de NOTCH como supresor tumoral en neoplasias mieloides (Lobry et al. 2014), de manera que la inhibición de DYRK1A en los tumores relacionados con NOTCH puede tener consecuencias positivas o negativas en el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas. Algo similar sucede con la proteína REST, que presenta propiedades antitumorales en las células epiteliales y puede actuar como un oncogén en tumores neurales (meduloblastoma, neuroblastoma y GBM) (Lawinger et al. 2000; Negrini et al. 2013; Su et al. 2006; Conti et al. 2012; Kamal et al. 2012; Palm et al. 1999). Se ha demostrado que REST puede activar la transcripción de *DYRK1A* a través de una NRSE (del inglés *Neuron Restrictive Silencer Element*) presente en la región promotora de *DYRK1A*. Además, *REST* y *DYRK1A* se expresan coordinadamente durante el desarrollo neural y un desequilibrio en los niveles de *DYRK1A* puede desestabilizar la expresión proteica de REST y reducir su actividad transcripcional (Lu et al. 2011). Se trataría de una regulación mucho más compleja, ya que *DYRK1A* podría actuar como modulador positivo o negativo de la expresión/actividad de REST, que, a su vez, puede tener actividad oncogénica o supresora de tumores dependiendo del tejido en el que se exprese.

En base a todo lo anterior, sería interesante realizar un estudio en profundidad del efecto de la inhibición de la actividad quinasa de *DYRK1A* en las TICs de GBM sobre los distintos sustratos que regula, implicados en mecanismos de supervivencia, proliferación, resistencia a la apoptosis y angiogénesis en este tipo de tumores. De este modo, se podría dilucidar si el efecto de la inhibición de *DYRK1A* sobre las TICs de GBM, aunque mediado por la disminución de la estabilidad de EGFR, se puede deber también a la alteración de vías de señalización adicionales. Estos estudios permitirían sugerir si la inhibición de *DYRK1A* podría ser beneficiosa en otro tipo de neoplasias, ya sea porque dependan directamente de la estabilidad de EGFR (tumores de pulmón, mama o colon), o bien porque dependan de algún otro sustrato de *DYRK1A*.

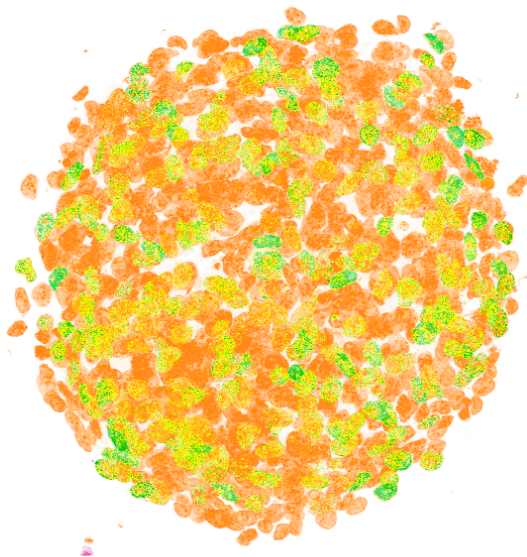
8. Comparativa entre la inhibición directa de EGFR o a través de la inhibición de *DYRK1A*, posibles sinergias

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la efectividad de la inhibición de la actividad de EGFR mediante dos estrategias diferentes: la inhibición directa de la actividad quinasa de EGFR con dacomitinib y la disminución de la estabilidad del receptor mediante la inhibición de la actividad quinasa de *DYRK1A*. En ambos casos se logra un notable efecto antitumoral sobre las TICs de GBM dependientes de EGFR. No obstante, existen ciertas diferencias en cuanto al efecto de los dos abordajes terapéuticos mencionados: mientras que dacomitinib pierde efectividad en un contexto celular PTEN-deficiente, la inhibición de *DYRK1A* (y reducción de la estabilidad de EGFR) sigue siendo efectiva en este tipo de células. Además, en los tumores

tratados con harmina se observan áreas de necrosis más grandes y abundantes que en los tratados con dacomitinib, a pesar de que no se han podido utilizar dosis muy elevadas del primero.

A la luz de nuestros resultados, se podría proponer un abordaje terapéutico que combinara las dos estrategias dirigidas contra EGFR, para alcanzar una inhibición más efectiva del receptor. De hecho, se ha visto que el inhibidor de la actividad quinasa de DYRK1A EGCG tiene un potente efecto antitumoral sinérgico con erlotinib en cáncer de pulmón (Milligan et al. 2009) y en HNSCC (Zhang et al. 2008). En este contexto, se ha asociado el incremento de MIG-6, y la consiguiente disminución de la actividad de EGFR, con la resistencia a los inhibidores del receptor, pudiéndose predecir la sensibilidad a este tipo de tratamientos en base al ratio *MIG-6/EGFR* en los tumores (Chang et al. 2013; Ferby et al. 2006; Naruo et al. 2011). En este punto de la discusión, es necesario recordar la importancia de la caracterización molecular de los GBMs, que permitiría la selección del tratamiento más adecuado y efectivo para cada paciente. Un caso particular sería la detección de la amplificación de *EGFR* como paso previo a la administración de dacomitinib, independientemente de la presencia de EGFRvIII, ya que aquellos tumores con la forma salvaje del receptor no responden al tratamiento con el inhibidor de EGFR. Si además se quisiera actuar sobre la estabilidad de EGFR mediante la inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A, sería interesante analizar los niveles de expresión de dicha proteína. En este contexto, hay que destacar la existencia de una correlación positiva entre la expresión de EGFR y la de DYRK1A en gliomas, de modo que los tumores dependientes de EGFR (con amplificación génica del receptor) suelen presentar niveles elevados de DYRK1A. Esto favorecería el uso combinado de ambas estrategias, pudiendo predecir una respuesta favorable en aquellos GBMs EGFR-dependientes, en presencia o ausencia de EGFRvIII. Asimismo, se ha observado que la disminución de la capacidad tumoral *in vivo* de las TICs de GBM que carecen de PTEN funcional sería posible mediante la inhibición de DYRK1A pero no con el uso de dacomitinib, sugiriendo que la inhibición combinada de ambas vías podría ser una estrategia efectiva para el tratamiento de los tumores con alteraciones moleculares asociadas a una falta de respuesta a los inhibidores de EGFR.

Por otro lado, sería importante analizar si tanto dacomitinib como los inhibidores de DYRK1A podrían tener un efecto sinérgico con las pautas estándar de tratamiento (RT y QT con TMZ). De hecho, en los últimos años se ha sugerido una mejor respuesta a RT de los pacientes al combinarla con la administración de inhibidores de EGFR (Chakravarti et al. 2002; Geoerger et al. 2008; Stea et al. 2003). Dado que las dos estrategias analizadas en este trabajo inciden principalmente sobre las TICs de GBM, especialmente resistentes a dichos tratamientos, se podría predecir que la combinación de ambas aproximaciones supondría una gran ventaja terapéutica para los pacientes con GBM.

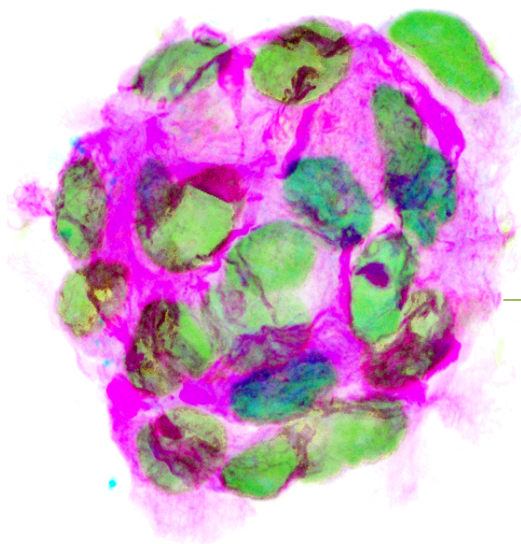


CONCLUSIONES

1. Dacomitinib es capaz de inhibir la supervivencia y la capacidad de autorrenovación y proliferación *in vitro* de las TICs de GBM que presentan amplificación de *EGFR*, con independencia de la expresión de la forma mutante EGFRvIII.
2. La administración sistémica de dacomitinib limita el crecimiento tumoral *in vivo* mediante la inhibición de la activación de EGFR y de las principales moléculas efectoras de la vía de señalización del receptor, siendo especialmente consistente la de la proteína ribosomal S6.
3. Dacomitinib ejerce un efecto diferenciador en los tumores generados tras la inyección de TICs de GBM caracterizado por la disminución de los niveles de expresión de marcadores característicos de células madre (*CD133*, *LIF*, *ID1*, *Nanog* y *Sox2*) y la generación de tumores con un fenotipo histológico menos agresivo que los controles. Sin embargo, el tratamiento con dacomitinib no induce un incremento consistente de la expresión de marcadores de diferenciación terminal característicos de las células maduras del SNC.
4. El efecto de dacomitinib sobre la capacidad tumorigénica de las TICs de GBM *in vivo* es reversible, de manera que los tumores tratados recuperan su tasa de crecimiento exponencial tras retirar la administración sistémica del inhibidor de EGFR.
5. La ausencia de PTEN funcional limita el efecto antitumoral de dacomitinib en una línea de TICs de GBM con amplificación de *EGFR*. El tratamiento es efectivo inhibiendo la fosforilación del receptor, sin embargo, no es capaz de inhibir la activación de la vía de señalización subsecuente y ejerce un efecto reducido sobre el crecimiento tumoral *in vivo* respecto a las demás líneas de GBM dependientes del receptor pero con expresión de PTEN salvaje.
6. La presencia de DYRK1A es esencial para la expansión de las TICs de GBM dependientes de EGFR, de manera que la disminución de su expresión génica y la inhibición de su actividad quinasa afectan de forma irreversible a la capacidad de autorrenovación de dichos cultivos celulares.
7. DYRK1A controla la expansión de las TICs de GBM *in vivo* y su silenciamiento previene el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales, disminuyendo la carga tumoral. La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de DYRK1A tiene el mismo efecto.
8. El efecto de la inhibición de la actividad quinasa de DYRK1A en TICs de GBM es dependiente de la expresión proteica de EGFR por parte de las células tumorales y es efectiva en células

de GBM con amplificación de *EGFR*, con independencia de la presencia de la forma mutante EGFRvIII y de la ausencia de PTEN funcional.

9. Harmina es capaz de acceder al cerebro de los ratones y de inhibir la actividad quinasa de DYRK1A, favoreciendo la degradación y disminución de los niveles de EGFR, sin embargo, la administración de dosis elevadas de este inhibidor produce efectos neurológicos no deseados. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos inhibidores de la actividad quinasa de DYRK1A más específicos y que puedan ser evaluados en ensayos clínicos con pacientes de GBM que presentan tumores dependientes de EGFR.
10. La inhibición de DYRK1A limita la estabilidad y los niveles de EGFR en la membrana celular y reduce la capacidad del receptor para activar las vías de señalización subyacentes, tanto dependientes como independientes de su actividad quinasa. Dicho efecto está mediado por SPRY2.



BIBLIOGRAFÍA

- (1) 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, (7216) 1061-1068
- (2) Aguado, T., Carracedo, A., Julien, B., Velasco, G., Milman, G., Mechoulam, R., Alvarez, L., Guzman, M., & Galve-Roperh, I. 2007. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J.Biol.Chem.*, 282, (9) 6854-6862
- (3) Ahn, K.J., Jeong, H.K., Choi, H.S., Ryoo, S.R., Kim, Y.J., Goo, J.S., Choi, S.Y., Han, J.S., Ha, I., & Song, W.J. 2006. DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol.Dis.*, 22, (3) 463-472
- (4) Akhavan, D., Pourzia, A.L., Nourian, A.A., Williams, K.J., Nathanson, D., Babic, I., Villa, G.R., Tanaka, K., Nael, A., Yang, H., Dang, J., Vinters, H.V., Yong, W.H., Flagg, M., Tamanoi, F., Sasayama, T., James, C.D., Kornblum, H.I., Cloughesy, T.F., Cavenee, W.K., Bensinger, S.J., & Mischel, P.S. 2013. De-repression of PDGFRbeta transcription promotes acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma patients. *Cancer Discov.*, 3, (5) 534-547
- (5) Altaba, A. 2011. Hedgehog signaling and the Gli code in stem cells, cancer, and metastases. *Sci Signal.*, 4, (200) t9
- (6) Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J.R., Florez, J., Fillat, C., & Estivill, X. 2001. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, 10, (18) 1915-1923
- (7) Alvarez, M., Altafaj, X., Aranda, S., & de la, L.S. 2007. DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol.Biol.Cell*, 18, (4) 1167-1178
- (8) Antonyak, M.A., Moscatello, D.K., & Wong, A.J. 1998. Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol.Chem.*, 273, (5) 2817-2822
- (9) Aranda, S., Alvarez, M., Turro, S., Laguna, A., & de la, L.S. 2008. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol.Cell Biol.*, 28, (19) 5899-5911
- (10) Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J.R., Chen, L., Heit, J.J., Kim, S.K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Francke, U., Graef, I.A., & Crabtree, G.R. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*, 441, (7093) 595-600

- (11) Avraham, R. & Yarden, Y. 2011. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat.Rev Mol.Cell Biol.*, 12, (2) 104-117
- (12) Baek, K.H., Zaslavsky, A., Lynch, R.C., Britt, C., Okada, Y., Siarey, R.J., Lensch, M.W., Park, I.H., Yoon, S.S., Minami, T., Korenberg, J.R., Folkman, J., Daley, G.Q., Aird, W.C., Galdzicki, Z., & Ryeom, S. 2009. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature*, 459, (7250) 1126-1130
- (13) Bai, D., Ueno, L., & Vogt, P.K. 2009. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer*, 125, (12) 2863-2870
- (14) Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., & Cohen, P. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem.J*, 408, (3) 297-315
- (15) Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., & von, D.A. 2008. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.*, 116, (6) 597-602
- (16) Barbachano, A., Ordonez-Moran, P., Garcia, J.M., Sanchez, A., Pereira, F., Larriba, M.J., Martinez, N., Hernandez, J., Landolfi, S., Bonilla, F., Palmer, H.G., Rojas, J.M., & Munoz, A. 2010. SPROUTY-2 and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumourigenicity. *Oncogene*, 29, (34) 4800-4813
- (17) Barker, F.G., Davis, R.L., Chang, S.M., & Prados, M.D. 1996. Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. *Cancer*, 77, (6) 1161-1166
- (18) Batchelor, T.T., Betensky, R.A., Esposito, J.M., Pham, L.D., Dorfman, M.V., Piscatelli, N., Jhung, S., Rhee, D., & Louis, D.N. 2004. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 10, (1 Pt 1) 228-233
- (19) Bauer, S. & Patterson, P.H. 2006. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *Journal of Neuroscience*, 26, (46) 12089-12099
- (20) Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., & Crabtree, G.R. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, 275, (5308) 1930-1934
- (21) Becker, W. & Sippl, W. 2011. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J*, 278, (2) 246-256
- (22) Becker, W., Soppa, U., & Tejedor, F.J. 2014. DYRK1A: a potential drug target for multiple Down syndrome neuropathologies. *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets.*, 13, (1) 26-33

- (23) Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirmbter, K., Tejedor, F.J., & Joost, H.G. 1998. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol.Chem.*, 273, (40) 25893-25902
- (24) Beier, D., Schulz, J.B., & Beier, C.P. 2011. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol.Cancer*, 10, 128
- (25) Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yanez, I., Martinez de, L.M., Arbones, M.L., Fotaki, V., Defelipe, J., & Elston, G.N. 2005. Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol.Dis.*, 20, (1) 115-122
- (26) Bianco, R., Shin, I., Ritter, C.A., Yakes, F.M., Basso, A., Rosen, N., Tsurutani, J., Dennis, P.A., Mills, G.B., & Arteaga, C.L. 2003. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 22, (18) 2812-2822
- (27) Bode, U., Massimino, M., Bach, F., Zimmermann, M., Khuhlaeva, E., Westphal, M., & Fleischhack, G. 2012. Nimotuzumab treatment of malignant gliomas. *Expert.Opin.Biol.Ther.*, 12, (12) 1649-1659
- (28) Boerner, J.L., Demory, M.L., Silva, C., & Parsons, S.J. 2004. Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol.Cell Biol.*, 24, (16) 7059-7071
- (29) Bots, M. & Johnstone, R.W. 2009. Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clin.Cancer Res.*, 15, (12) 3970-3977
- (30) Brantley, E.C. & Benveniste, E.N. 2008. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol.Cancer Res*, 6, (5) 675-684
- (31) Bredel, M., Scholtens, D.M., Yadav, A.K., Alvarez, A.A., Renfrow, J.J., Chandler, J.P., Yu, I.L., Carro, M.S., Dai, F., Tagge, M.J., Ferrarese, R., Bredel, C., Phillips, H.S., Lukac, P.J., Robe, P.A., Weyerbrock, A., Vogel, H., Dubner, S., Mobley, B., He, X., Scheck, A.C., Sikic, B.I., Aldape, K.D., Chakravarti, A., & Harsh, G.R. 2011. NFKBIA deletion in glioblastomas. *N Engl J Med*, 364, (7) 627-637
- (32) Brescia, P., Richichi, C., & Pelicci, G. 2012. Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory? *J.Oncol.*, 2012, 376894
- (33) Cabrita, M.A. & Christofori, G. 2008. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis.*, 11, (1) 53-62

- (34) Canzonetta, C., Mulligan, C., Deutsch, S., Ruf, S., O'Doherty, A., Lyle, R., Borel, C., Lin-Marq, N., Delom, F., Groet, J., Schnappauf, F., De Vita, S., Averill, S., Priestley, J.V., Martin, J.E., Shipley, J., Denyer, G., Epstein, C.J., Fillat, C., Estivill, X., Tybulewicz, V.L., Fisher, E.M., Antonarakis, S.E., & Nizetic, D. 2008. DYRK1A-dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome. *Am J Hum.Genet.*, 83, (3) 388-400
- (35) Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., & Lo, H.W. 2011. EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol.Cancer*, 10, 26
- (36) Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M.A., Latham, D.E., & Loeffler, J.S. 2002. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res*, 62, (15) 4307-4315
- (37) Chamberlain, M.C. 2010. Emerging clinical principles on the use of bevacizumab for the treatment of malignant gliomas. *Cancer*, 116, (17) 3988-3999
- (38) Chang, X., Izumchenko, E., Solis, L.M., Kim, M.S., Chatterjee, A., Ling, S., Monitto, C.L., Harari, P.M., Hidalgo, M., Goodman, S.N., Wistuba, I.I., Bedi, A., & Sidransky, D. 2013. The relative expression of Mig6 and EGFR is associated with resistance to EGFR kinase inhibitors. *PLoS.One.*, 8, (7) e68966
- (39) Choi, B.D., Archer, G.E., Mitchell, D.A., Heimberger, A.B., McLendon, R.E., Bigner, D.D., & Sampson, J.H. 2009. EGFRvIII-targeted vaccination therapy of malignant glioma. *Brain Pathol.*, 19, (4) 713-723
- (40) Ciccolini, F., Mandl, C., Holz-Wenig, G., Kehlenbach, A., & Hellwig, A. 2005. Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Developmental Biology*, 284, (1) 112-125
- (41) Clarke, J., Butowski, N., & Chang, S. 2010. Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch.Neurol.*, 67, (3) 279-283
- (42) Coates, G.H. & Cox, B. 1972. Harmine tremor after brain monoamine oxidase inhibition in the mouse. *Eur J Pharmacol.*, 18, (2) 284-286
- (43) Combs, S.E., Heeger, S., Haselmann, R., Edler, L., Debus, J., & Schulz-Ertner, D. 2006. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer*, 6, 133

- (44) Conti, L., Crisafulli, L., Caldera, V., Tortoreto, M., Brilli, E., Conforti, P., Zunino, F., Magrassi, L., Schiffer, D., & Cattaneo, E. 2012. REST controls self-renewal and tumorigenic competence of human glioblastoma cells. *PLoS.One.*, 7, (6) e38486
- (45) de, I., I, Konopka, G., Lim, K.L., Nutt, C.L., Bromberg, J.F., Frank, D.A., Mischel, P.S., Louis, D.N., & Bonni, A. 2008. Deregulation of a STAT3-interleukin 8 signaling pathway promotes human glioblastoma cell proliferation and invasiveness. *J Neurosci.*, 28, (23) 5870-5878
- (46) Demory, M.L., Boerner, J.L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Huttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., & Parsons, S.J. 2009. Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J Biol.Chem.*, 284, (52) 36592-36604
- (47) Desjardins, A. & Friedman, H.S. 2014. Bevacizumab therapy for glioblastoma: a passionate discussion. *CNS.Oncol.*, 3, (1) 1-3
- (48) Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., & Rodemann, H.P. 2005. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol.Chem.*, 280, (35) 31182-31189
- (49) Dittmann, K., Mayer, C., Rodemann, H.P., & Huber, S.M. 2013. EGFR cooperates with glucose transporter SGLT1 to enable chromatin remodeling in response to ionizing radiation. *Radiother.Oncol.*, 107, (2) 247-251
- (50) Dittmann, K., Mayer, C., Wanner, G., Kehlbach, R., & Rodemann, H.P. 2007. The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor- and DNA-dependent kinase phosphorylation. *Radiother.Oncol.*, 84, (3) 328-334
- (51) Downward, J., Parker, P., & Waterfield, M.D. 1984a. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature*, 311, (5985) 483-485
- (52) Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., & Waterfield, M.D. 1984b. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307, (5951) 521-527
- (53) Egan, J.E., Hall, A.B., Yatsula, B.A., & Bar-Sagi, D. 2002. The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 99, (9) 6041-6046
- (54) Endres, N.F., Engel, K., Das, R., Kovacs, E., & Kuriyan, J. 2011. Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 21, (6) 777-784

- (55) Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Gale, C.M., Lifshits, E., Gonzales, A.J., Shimamura, T., Zhao, F., Vincent, P.W., Naumov, G.N., Bradner, J.E., Althaus, I.W., Gandhi, L., Shapiro, G.I., Nelson, J.M., Heymach, J.V., Meyerson, M., Wong, K.K., & Janne, P.A. 2007. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Research*, 67, (24) 11924-11932
- (56) Fan, Q.W., Cheng, C.K., Gustafson, W.C., Charron, E., Zipper, P., Wong, R.A., Chen, J., Lau, J., Knobbe-Thomsen, C., Weller, M., Jura, N., Reifemberger, G., Shokat, K.M., & Weiss, W.A. 2013. EGFR Phosphorylates Tumor-Derived EGFRvIII Driving STAT3/5 and Progression in Glioblastoma. *Cancer Cell*, 24, (4) 438-449
- (57) Fenton, T.R., Nathanson, D., Ponte, d.A., Kuga, D., Iwanami, A., Dang, J., Yang, H., Tanaka, K., Oba-Shinjo, S.M., Uno, M., Inda, M.M., Wykosky, J., Bachoo, R.M., James, C.D., DePinho, R.A., VandenBerg, S.R., Zhou, H., Marie, S.K., Mischel, P.S., Cavenee, W.K., & Furnari, F.B. 2012. Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 109, (35) 14164-14169
- (58) Ferby, I., Reschke, M., Kudlacek, O., Knyazev, P., Pante, G., Amann, K., Sommergruber, W., Kraut, N., Ullrich, A., Fassler, R., & Klein, R. 2006. Mig6 is a negative regulator of EGF receptor-mediated skin morphogenesis and tumor formation. *Nat.Med*, 12, (5) 568-573
- (59) Fernandez-Martinez, J., Vela, E.M., Tora-Ponsioen, M., Ocana, O.H., Nieto, M.A., & Galceran, J. 2009. Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A. *J Cell Sci*, 122, (Pt 10) 1574-1583
- (60) Ferron, S.R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la, L.S., Sanchez, P., Arbones, M.L., & Farinas, I. 2010. Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell*, 7, (3) 367-379
- (61) Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G., & James, C.D. 2000. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60, (5) 1383-1387
- (62) Fujisawa, H., Reis, R.M., Nakamura, M., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., & Ohgaki, H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*, 80, (1) 65-72
- (63) Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R.A., & Cavenee, W.K. 2007.

- Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, 21, (21) 2683-2710
- (64) Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., DiMeco, F., & Vescovi, A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64, (19) 7011-7021
- (65) Gallia, G.L., Rand, V., Siu, I.M., Eberhart, C.G., James, C.D., Marie, S.K., Oba-Shinjo, S.M., Carlotti, C.G., Caballero, O.L., Simpson, A.J., Brock, M.V., Massion, P.P., Carson, B.S., Sr., & Riggins, G.J. 2006. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol.Cancer Res*, 4, (10) 709-714
- (66) Gan, H.K., Cvrljevic, A.N., & Johns, T.G. 2013. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.*, 280, (21) 5350-5370
- (67) Geoerger, B., Gaspar, N., Opolon, P., Morizet, J., Devanz, P., Lecluse, Y., Valent, A., Lacroix, L., Grill, J., & Vassal, G. 2008. EGFR tyrosine kinase inhibition radiosensitizes and induces apoptosis in malignant glioma and childhood ependymoma xenografts. *Int J Cancer*, 123, (1) 209-216
- (68) Gingras, A.C., Raught, B., & Sonenberg, N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.*, 15, (7) 807-826
- (69) Glennon, R.A., Dukat, M., Grella, B., Hong, S., Costantino, L., Teitler, M., Smith, C., Egan, C., Davis, K., & Mattson, M.V. 2000. Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT(2) and 5-HT(1A)), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend.*, 60, (2) 121-132
- (70) Gockler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., & Becker, W. 2009. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.*, 276, (21) 6324-6337
- (71) Gonzales, A.J., Hook, K.E., Althaus, I.W., Ellis, P.A., Trachet, E., Delaney, A.M., Harvey, P.J., Ellis, T.A., Amato, D.M., Nelson, J.M., Fry, D.W., Zhu, T., Loi, C.M., Fakhoury, S.A., Schlosser, K.M., Sexton, K.E., Winters, R.T., Reed, J.E., Bridges, A.J., Lettiere, D.J., Baker, D.A., Yang, J.X., Lee, H.T., Tecle, H., & Vincent, P.W. 2008. Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7, (7) 1880-1889

- (72) Greenall, S.A., Donoghue, J.F., Gottardo, N.G., Johns, T.G., & Adams, T.E. 2014. Glioma-specific Domain IV EGFR cysteine mutations promote ligand-induced covalent receptor dimerization and display enhanced sensitivity to dacomitinib in vivo. *Oncogene*
- (73) Guan, Y., Louis, E.D., & Zheng, W. 2001. Toxicokinetics of tremorogenic natural products, harmine and harmine, in male Sprague-Dawley rats. *J.Toxicol.Environ.Health A*, 64, (8) 645-660
- (74) Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., & Pritchard, M. 1999. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics*, 57, (3) 407-418
- (75) Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A.M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., & Pritchard, M.A. 1996. A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum.Mol.Genet.*, 5, (9) 1305-1310
- (76) Guo, X., Williams, J.G., Schug, T.T., & Li, X. 2010. DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J Biol.Chem.*, 285, (17) 13223-13232
- (77) Gur, G., Rubin, C., Katz, M., Amit, I., Citri, A., Nilsson, J., Amariglio, N., Henriksson, R., Rechavi, G., Hedman, H., Wides, R., & Yarden, Y. 2004. LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J*, 23, (16) 3270-3281
- (78) Haas-Kogan, D.A., Prados, M.D., Tihan, T., Eberhard, D.A., Jelluma, N., Arvold, N.D., Baumber, R., Lamborn, K.R., Kapadia, A., Malec, M., Berger, M.S., & Stokoe, D. 2005. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst*, 97, (12) 880-887
- (79) Hammerle, B., Elizalde, C., & Tejedor, F.J. 2008. The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene Mnb/Dyrk1A in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *Eur J Neurosci.*, 27, (5) 1061-1074
- (80) Hammerle, B., Ulin, E., Guimera, J., Becker, W., Guillemot, F., & Tejedor, F.J. 2011. Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development*, 138, (12) 2543-2554

- (81) Hamsa, T.P. & Kuttan, G. 2010. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol.*, 649, (1-3) 64-73
- (82) Han, W. & Lo, H.W. 2012. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.*
- (83) Hanabata, Y., Nakajima, Y., Morita, K., Kayamori, K., & Omura, K. 2012. Coexpression of SGLT1 and EGFR is associated with tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Odontology.*, 100, (2) 156-163
- (84) Hanada, N., Lo, H.W., Day, C.P., Pan, Y., Nakajima, Y., & Hung, M.C. 2006. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol.Carcinog.*, 45, (1) 10-17
- (85) Hasle, H., Clemmensen, I.H., & Mikkelsen, M. 2000. [Incidence of cancer in individuals with Down syndrome]. *Tidsskr.Nor Laegeforen.*, 120, (24) 2878-2881
- (86) Hatanpaa, K.J., Burma, S., Zhao, D., & Habib, A.A. 2010. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia.*, 12, (9) 675-684
- (87) He, X.Y., Liu, X.J., Chen, X., Bian, L.G., Zhao, W.G., Shen, J.K., & Sun, Q.F. 2013. Gambogic acid induces EGFR degradation and Akt/mTORC1 inhibition through AMPK dependent-LRIG1 upregulation in cultured U87 glioma cells. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 435, (3) 397-402
- (88) Hegi, M.E., Diserens, A.C., Bady, P., Kamoshima, Y., Kouwenhoven, M.C., Delorenzi, M., Lambiv, W.L., Hamou, M.F., Matter, M.S., Koch, A., Heppner, F.L., Yonekawa, Y., Merlo, A., Frei, K., Mariani, L., & Hofer, S. 2011. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Mol.Cancer Ther.*, 10, (6) 1102-1112
- (89) Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de, T.N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., & Stupp, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N.Engl.J.Med.*, 352, (10) 997-1003
- (90) Hegi, M.E., Rajakannu, P., & Weller, M. 2012. Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Curr.Opin.Neurol.*, 25, (6) 774-779

- (91) Heimberger, A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., & Aldape, K. 2005. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res*, 11, (4) 1462-1466
- (92) Himpel, S., Panzer, P., Eirimbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L.C., Blundell, T., Kentrup, H., Grotzinger, J., Joost, H.G., & Becker, W. 2001. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem.J*, 359, (Pt 3) 497-505
- (93) Hitzler, J.K., Cheung, J., Li, Y., Scherer, S.W., & Zipursky, A. 2003. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*, 101, (11) 4301-4304
- (94) Hollanda, L.M., Lima, C.S., Cunha, A.F., Albuquerque, D.M., Vassallo, J., Ozelo, M.C., Joazeiro, P.P., Saad, S.T., & Costa, F.F. 2006. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat.Genet.*, 38, (7) 807-812
- (95) Hong, J.Y., Park, J.I., Lee, M., Munoz, W.A., Miller, R.K., Ji, H., Gu, D., Sokol, S.Y., & McCrea, P.D. 2012. Down's-syndrome-related kinase Dyrk1A modulates the p120-catenin-Kaiso trajectory of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci*, 125, (Pt 3) 561-569
- (96) Howard, B.M., Gursel, D.B., Bleau, A.M., Beyene, R.T., Holland, E.C., & Boockvar, J.A. 2010. EGFR signaling is differentially activated in patient-derived glioblastoma stem cells. *J.Exp.Ther.Oncol.*, 8, (3) 247-260
- (97) Hsu, S.C. & Hung, M.C. 2007. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J Biol.Chem.*, 282, (14) 10432-10440
- (98) Hsuan, J.J. 1993. Oncogene regulation by growth factors. *Anticancer Res*, 13, (6B) 2521-2532
- (99) Hu, J., Jo, M., Cavenee, W.K., Furnari, F., VandenBerg, S.R., & Gonias, S.L. 2011. Crosstalk between the urokinase-type plasminogen activator receptor and EGF receptor variant III supports survival and growth of glioblastoma cells. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 108, (38) 15984-15989
- (100) Hubbard, S.R. 2009. The juxtamembrane region of EGFR takes center stage. *Cell*, 137, (7) 1181-1183
- (101) Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Zalutsky, M.R., Fuller, G.N., Archer, G.E., Friedman, H.S., Kwatra, M.M., Bigner, S.H., & Bigner, D.D. 1990. Anti-synthetic peptide

- antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 87, (11) 4207-4211
- (102) Hung, L.Y., Tseng, J.T., Lee, Y.C., Xia, W., Wang, Y.N., Wu, M.L., Chuang, Y.H., Lai, C.H., & Chang, W.C. 2008. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res*, 36, (13) 4337-4351
- (103) Husbands, S.M., Glennon, R.A., Gorgerat, S., Gough, R., Tyacke, R., Crosby, J., Nutt, D.J., Lewis, J.W., & Hudson, A.L. 2001. beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend.*, 64, (2) 203-208
- (104) Hynes, N.E. & MacDonald, G. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 21, (2) 177-184
- (105) Imai, S. & Guarente, L. 2014. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.*, 24, (8) 464-471
- (106) Inda, M.M., Bonavia, R., Mukasa, A., Narita, Y., Sah, D.W., Vandenberg, S., Brennan, C., Johns, T.G., Bachoo, R., Hadwiger, P., Tan, P., DePinho, R.A., Cavenee, W., & Furnari, F. 2010. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev.*, 24, (16) 1731-1745
- (107) Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K.L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat.Cell Biol.*, 4, (9) 648-657
- (108) Ionescu, A., Dufrasne, F., Gelbcke, M., Jabin, I., Kiss, R., & Lamoral-Theys, D. 2012. DYRK1A kinase inhibitors with emphasis on cancer. *Mini.Rev.Med.Chem.*, 12, (13) 1315-1329
- (109) Irwin, M.E., Bohin, N., & Boerner, J.L. 2011. Src family kinases mediate epidermal growth factor receptor signaling from lipid rafts in breast cancer cells. *Cancer Biol.Ther.*, 12, (8) 718-726
- (110) Ivliev, A.E., 't Hoen, P.A., & Sergeeva, M.G. 2010. Coexpression network analysis identifies transcriptional modules related to proastrocytic differentiation and sprouty signaling in glioma. *Cancer Res*, 70, (24) 10060-10070
- (111) Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D.C., Bogdanovic, J., Huo, Q., & Turkson, J. 2011. A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PLoS.One.*, 6, (5) e19605

- (112) Janne, P.A., Boss, D.S., Camidge, D.R., Britten, C.D., Engelman, J.A., Garon, E.B., Guo, F., Wong, S., Liang, J., Letrent, S., Millham, R., Taylor, I., Eckhardt, S.G., & Schellens, J.H. 2011. Phase I dose-escalation study of the pan-HER inhibitor, PF299804, in patients with advanced malignant solid tumors. *Clin.Cancer Res.*, 17, (5) 1131-1139
- (113) Jin, X., Yin, J., Kim, S.H., Sohn, Y.W., Beck, S., Lim, Y.C., Nam, D.H., Choi, Y.J., & Kim, H. 2011. EGFR-AKT-Smad signaling promotes formation of glioma stem-like cells and tumor angiogenesis by ID3-driven cytokine induction. *Cancer Res*, 71, (22) 7125-7134
- (114) Johansson, M., Oudin, A., Tiemann, K., Bernard, A., Golebiewska, A., Keunen, O., Fack, F., Stieber, D., Wang, B., Hedman, H., & Niclou, S.P. 2013. The soluble form of the tumor suppressor Lrig1 potentially inhibits in vivo glioma growth irrespective of EGF receptor status. *Neuro.Oncol.*, 15, (9) 1200-1211
- (115) Kamal, M.M., Sathyan, P., Singh, S.K., Zinn, P.O., Marisetty, A.L., Liang, S., Gumin, J., El Mesallamy, H.O., Suki, D., Colman, H., Fuller, G.N., Lang, F.F., & Majumder, S. 2012. REST Regulates Oncogenic Properties of Glioblastoma Stem Cells. *Stem Cells*, 30, (3) 405-414
- (116) Kamran, M.Z., Patil, P., & Gude, R.P. 2013. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed.Res Int*, 2013, 421821
- (117) Kanaly, C.W., Ding, D., Heimberger, A.B., & Sampson, J.H. 2010. Clinical applications of a peptide-based vaccine for glioblastoma. *Neurosurg.Clin N Am*, 21, (1) 95-109
- (118) Kang, C.S., Zhang, Z.Y., Jia, Z.F., Wang, G.X., Qiu, M.Z., Zhou, H.X., Yu, S.Z., Chang, J., Jiang, H., & Pu, P.Y. 2006. Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.*, 13, (5) 530-538
- (119) Karpel-Massler, G., Schmidt, U., Unterberg, A., & Halatsch, M.E. 2009. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol.Cancer Res*, 7, (7) 1000-1012
- (120) Kim, E., Kim, M., Woo, D.H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y.T., Kim, H., Rhee, J., Nakano, I., Lee, C., Joo, K.M., Rich, J.N., Nam, D.H., & Lee, J. 2013. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell*, 23, (6) 839-852
- (121) Kim, E.J., Sung, J.Y., Lee, H.J., Rhim, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Min, d.S., Kim, J., Paik, S.R., & Chung, K.C. 2006. Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J.Biol.Chem.*, 281, (44) 33250-33257

- (122) Kim, H., Sablin, S.O., & Ramsay, R.R. 1997. Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch.Biochem.Biophys.*, 337, (1) 137-142
- (123) Kim, H.J., Taylor, L.J., & Bar-Sagi, D. 2007. Spatial regulation of EGFR signaling by Sprouty2. *Curr.Biol.*, 17, (5) 455-461
- (124) Kita, D., Yonekawa, Y., Weller, M., & Ohgaki, H. 2007. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.*, 113, (3) 295-302
- (125) Koul, D. 2008. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol.Ther.*, 7, (9) 1321-1325
- (126) Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., & Schackert, G. 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130, (Pt 10) 2596-2606
- (127) Laederich, M.B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K.L., III, & Sweeney, C. 2004. The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Biol.Chem.*, 279, (45) 47050-47056
- (128) Laguna, A., Aranda, S., Barallobre, M.J., Barhoum, R., Fernandez, E., Fotaki, V., Delabar, J.M., de la, L.S., de, I., V, & Arbones, M.L. 2008. The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev.Cell*, 15, (6) 841-853
- (129) Lammering, G., Hewit, T.H., Valerie, K., Contessa, J.N., Amorino, G.P., Dent, P., & Schmidt-Ullrich, R.K. 2003. EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene*, 22, (36) 5545-5553
- (130) Lawinger, P., Venugopal, R., Guo, Z.S., Immaneni, A., Sengupta, D., Lu, W., Rastelli, L., Marin Dias, C.A., Levin, V., Fuller, G.N., Echelard, Y., & Majumder, S. 2000. The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nat.Med*, 6, (7) 826-831
- (131) Learn, C.A., Hartzell, T.L., Wikstrand, C.J., Archer, G.E., Rich, J.N., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Bigner, D.D., & Sampson, J.H. 2004. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, 10, (9) 3216-3224
- (132) Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., & Fine, H.A. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9, (5) 391-403

- (133) Lee, Y., Ha, J., Kim, H.J., Kim, Y.S., Chang, E.J., Song, W.J., & Kim, H.H. 2009. Negative feedback Inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *J.Biol.Chem.*, 284, (48) 33343-33351
- (134) Lepagnol-Bestel, A.M., Zvara, A., Maussion, G., Quignon, F., Ngimbous, B., Ramoz, N., Imbeaud, S., Loe-Mie, Y., Benihoud, K., Agier, N., Salin, P.A., Cardona, A., Khung-Savatovsky, S., Kallunki, P., Delabar, J.M., Puskas, L.G., Delacroix, H., Aggerbeck, L., Delezoide, A.L., Delattre, O., Gorwood, P., Moalic, J.M., & Simonneau, M. 2009. DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, 18, (8) 1405-1414
- (135) Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat.Rev Mol.Cell Biol.*, 3, (9) 651-662
- (136) Li, D., Jackson, R.A., Yusoff, P., & Guy, G.R. 2010. Direct association of Sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions. *J.Biol.Chem.*, 285, (46) 35374-35385
- (137) Li, L., Chakraborty, S., Yang, C.R., Hatanpaa, K.J., Cipher, D.J., Puliappadamba, V.T., Rehman, A., Jiwani, A.J., Mickey, B., Madden, C., Raisanen, J., Burma, S., Saha, D., Wang, Z., Pingle, S.C., Kesari, S., Boothman, D.A., & Habib, A.A. 2013. An EGFR wild type-EGFRvIII-HB-EGF feed-forward loop regulates the activation of EGFRvIII. *Oncogene*
- (138) Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., & Hung, M.C. 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat.Cell Biol.*, 3, (9) 802-808
- (139) Lisak, R., Truong, D., Carroll, W., & Bhidayasiri, R. 2009. *International Neurology*, 1 ed. Wiley.
- (140) Liu, H., Han, D., Liu, Y., Hou, X., Wu, J., Li, H., Yang, J., Shen, C., Yang, G., Fu, C., Li, X., Che, H., Ai, J., & Zhao, S. 2013. Harmine hydrochloride inhibits Akt phosphorylation and depletes the pool of cancer stem-like cells of glioblastoma. *J.Neurooncol.*, 112, (1) 39-48
- (141) Lo, H.W. 2010. Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discov.Med*, 10, (50) 44-51
- (142) Lo, H.W., Cao, X., Zhu, H., & Ali-Osman, F. 2008. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res*, 14, (19) 6042-6054

- (143) Lo, H.W., Cao, X., Zhu, H., & Ali-Osman, F. 2010. Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol.Cancer Res*, 8, (2) 232-245
- (144) Lobry, C., Oh, P., Mansour, M.R., Look, A.T., & Aifantis, I. 2014. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood*, 123, (16) 2451-2459
- (145) Lochhead, P.A., Sibbet, G., Morrice, N., & Cleghon, V. 2005. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell*, 121, (6) 925-936
- (146) Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., & Kleihues, P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*, 114, (2) 97-109
- (147) Lu, K.V., Zhu, S., Cvrljevic, A., Huang, T.T., Sarkaria, S., Ahkavan, D., Dang, J., Dinca, E.B., Plaisier, S.B., Oderberg, I., Lee, Y., Chen, Z., Caldwell, J.S., Xie, Y., Loo, J.A., Seligson, D., Chakravari, A., Lee, F.Y., Weinmann, R., Cloughesy, T.F., Nelson, S.F., Bergers, G., Graeber, T., Furnari, F.B., James, C.D., Cavenee, W.K., Johns, T.G., & Mischel, P.S. 2009. Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer Res*, 69, (17) 6889-6898
- (148) Lu, M., Zheng, L., Han, B., Wang, L., Wang, P., Liu, H., & Sun, X. 2011. REST regulates DYRK1A transcription in a negative feedback loop. *J Biol.Chem.*, 286, (12) 10755-10763
- (149) Luo, W. & Semenza, G.L. 2011. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget.*, 2, (7) 551-556
- (150) Lutes, J., Lorden, J.F., Beales, M., & Oltmans, G.A. 1988. Tolerance to the tremorogenic effects of harmaline: evidence for altered olivo-cerebellar function. *Neuropharmacology*, 27, (8) 849-855
- (151) Luwor, R.B., Johns, T.G., Murone, C., Huang, H.J., Cavenee, W.K., Ritter, G., Old, L.J., Burgess, A.W., & Scott, A.M. 2001. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res*, 61, (14) 5355-5361
- (152) Maa, M.C., Leu, T.H., McCarley, D.J., Schatzman, R.C., & Parsons, S.J. 1995. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 92, (15) 6981-6985

- (153) Mackay, H.J. & Twelves, C.J. 2007. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat.Rev Cancer*, 7, (7) 554-562
- (154) Maenz, B., Hekerman, P., Vela, E.M., Galceran, J., & Becker, W. 2008. Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1. *BMC Mol.Biol.*, 9, 30
- (155) Malinge, S., Bliss-Moreau, M., Kirsammer, G., Diebold, L., Chlon, T., Gurbuxani, S., & Crispino, J.D. 2012. Increased dosage of the chromosome 21 ortholog Dyrk1a promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. *J Clin Invest*, 122, (3) 948-962
- (156) Mancini, M. & Toker, A. 2009. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat.Rev Cancer*, 9, (11) 810-820
- (157) Mantel, N. 1966. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother.Rep.*, 50, (3) 163-170
- (158) Mao, J., Maye, P., Kogerman, P., Tejedor, F.J., Toftgard, R., Xie, W., Wu, G., & Wu, D. 2002. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol.Chem.*, 277, (38) 35156-35161
- (159) Marti, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la, L.S., Fotaki, V., Alvarez, M., Perez-Riba, M., Ferrer, I., & Estivill, X. 2003. Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res*, 964, (2) 250-263
- (160) Martinez de, L.M., Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yanez, I., Calvo, M., Morales, M., Fillat, C., Defelipe, J., Ramakers, G.J., & Dierssen, M. 2012. Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cereb.Cortex*, 22, (12) 2867-2877
- (161) Mason, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A., & Licht, J.D. 2006. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol.*, 16, (1) 45-54
- (162) Massard, C., Deutsch, E., & Soria, J.C. 2006. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann.Oncol.*, 17, (11) 1620-1624
- (163) Matsuo, R., Ochiai, W., Nakashima, K., & Taga, T. 2001. A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody. *J Immunol.Methods*, 247, (1-2) 141-151

- (164) Mawrin, C., Diete, S., Treuheit, T., Kropf, S., Vorwerk, C.K., Boltze, C., Kirches, E., Firsching, R., & Dietzmann, K. 2003. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol.*, 23, (3) 641-648
- (165) Mazzoleni, S., Politi, L.S., Pala, M., Cominelli, M., Franzin, A., Sergi, S.L., Falini, A., De Palma, M., Bulfone, A., Poliani, P.L., & Galli, R. 2010. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res*, 70, (19) 7500-7513
- (166) Mellinghoff, I.K., Wang, M.Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D.A., Zhu, S., Dia, E.Q., Lu, K.V., Yoshimoto, K., Huang, J.H., Chute, D.J., Riggs, B.L., Horvath, S., Liau, L.M., Cavenee, W.K., Rao, P.N., Beroukhi, R., Peck, T.C., Lee, J.C., Sellers, W.R., Stokoe, D., Prados, M., Cloughesy, T.F., Sawyers, C.L., & Mischel, P.S. 2005. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*, 353, (19) 2012-2024
- (167) Milligan, S.A., Burke, P., Coleman, D.T., Bigelow, R.L., Steffan, J.J., Carroll, J.L., Williams, B.J., & Cardelli, J.A. 2009. The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of c-Met and epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*, 15, (15) 4885-4894
- (168) Minna, J.D., Gazdar, A.F., Sprang, S.R., & Herz, J. 2004. Cancer. A bull's eye for targeted lung cancer therapy. *Science*, 304, (5676) 1458-1461
- (169) Mizoguchi, M., Nutt, C.L., Mohapatra, G., & Louis, D.N. 2004. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol.*, 14, (4) 372-377
- (170) Mrugala, M.M. 2013. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov.Med.*, 15, (83) 221-230
- (171) Muller, M.R. & Rao, A. 2010. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat.Rev Immunol.*, 10, (9) 645-656
- (172) Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W.K., & Huang, H.J. 1998. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 95, (10) 5724-5729
- (173) Nakamura, M., Yang, F., Fujisawa, H., Yonekawa, Y., Kleihues, P., & Ohgaki, H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 59, (6) 539-543

- (174) Nam, H.J., Ching, K.A., Kan, J., Kim, H.P., Han, S.W., Im, S.A., Kim, T.Y., Christensen, J.G., Oh, D.Y., & Bang, Y.J. 2012. Evaluation of the antitumor effects and mechanisms of PF00299804, a pan-HER inhibitor, alone or in combination with chemotherapy or targeted agents in gastric cancer. *Mol.Cancer Ther.*, 11, (2) 439-451
- (175) Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H.J., Furnari, F.B., & Cavenee, W.K. 2002. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res*, 62, (22) 6764-6769
- (176) Naruo, Y., Nagashima, T., Ushikoshi-Nakayama, R., Saeki, Y., Nakakuki, T., Naka, T., Tanaka, H., Tsai, S.F., & Okada-Hatakeyama, M. 2011. Epidermal growth factor receptor mutation in combination with expression of MIG6 alters gefitinib sensitivity. *BMC Syst.Biol.*, 5, 29
- (177) Nathanson, D.A., Gini, B., Mottahedeh, J., Visnyei, K., Koga, T., Gomez, G., Eskin, A., Hwang, K., Wang, J., Masui, K., Paucar, A., Yang, H., Ohashi, M., Zhu, S., Wykosky, J., Reed, R., Nelson, S.F., Cloughesy, T.F., James, C.D., Rao, P.N., Kornblum, H.I., Heath, J.R., Cavenee, W.K., Furnari, F.B., & Mischel, P.S. 2014. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science*, 343, (6166) 72-76
- (178) Negrini, S., Prada, I., D'Alessandro, R., & Meldolesi, J. 2013. REST: an oncogene or a tumor suppressor? *Trends Cell Biol.*, 23, (6) 289-295
- (179) Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.F., D'Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., In't, V.P., Michotte, A., & De Greve, J. 2009. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol.*, 20, (9) 1596-1603
- (180) Nicholas, M.K., Lukas, R.V., Jafri, N.F., Faoro, L., & Salgia, R. 2006. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res*, 12, (24) 7261-7270
- (181) Nizetic, D. & Groet, J. 2012. Tumorigenesis in Down's syndrome: big lessons from a small chromosome. *Nat.Rev Cancer*, 12, (10) 721-732
- (182) Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., & Ohgaki, H. 2009. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin.Cancer Res.*, 15, (19) 6002-6007
- (183) Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., Hosoya, T., Ito, N., & Hagiwara, M. 2010. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat.Comm.*, 1, 86

- (184) Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lutolf, U.M., & Kleihues, P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.*, 64, (19) 6892-6899
- (185) Ohgaki, H. & Kleihues, P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.*, 170, (5) 1445-1453
- (186) Ohgaki, H. & Kleihues, P. 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19, (4) 764-772
- (187) Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D.M., & Rao, A. 2004. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol.Cell Biol.*, 24, (10) 4184-4195
- (188) Ou, S.H. 2012. Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): a better mousetrap? A review of the clinical evidence. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 83, (3) 407-421
- (189) Palm, K., Metsis, M., & Timmusk, T. 1999. Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Brain Res Mol.Brain Res*, 72, (1) 30-39
- (190) Pandita, A., Aldape, K.D., Zadeh, G., Guha, A., & James, C.D. 2004. Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Genes Chromosomes.Cancer*, 39, (1) 29-36
- (191) Park, J., Oh, Y., Yoo, L., Jung, M.S., Song, W.J., Lee, S.H., Seo, H., & Chung, K.C. 2010. Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol.Chem.*, 285, (41) 31895-31906
- (192) Pastrana, E., Cheng, L.C., & Doetsch, F. 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 106, (15) 6387-6392
- (193) Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M.H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev*, 22, (2) 153-183
- (194) Pedersen, M.W., Pedersen, N., Ottesen, L.H., & Poulsen, H.S. 2005. Differential response to gefitinib of cells expressing normal EGFR and the mutant EGFRvIII. *Br.J Cancer*, 93, (8) 915-923

- (195) Peereboom, D.M., Shepard, D.R., Ahluwalia, M.S., Brewer, C.J., Agarwal, N., Stevens, G.H., Suh, J.H., Toms, S.A., Vogelbaum, M.A., Weil, R.J., Elson, P., & Barnett, G.H. 2010. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.*, 98, (1) 93-99
- (196) Penuelas, S., Anido, J., Prieto-Sanchez, R.M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., Garcia-Dorado, D., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Baselga, J., & Seoane, J. 2009. TGF-beta Increases Glioma-Initiating Cell Self-Renewal through the Induction of LIF in Human Glioblastoma. *Cancer Cell*, 15, (4) 315-327
- (197) Persano, L., Rampazzo, E., Basso, G., & Viola, G. 2013. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem.Pharmacol.*, 85, (5) 612-622
- (198) Peterson, T.S., Thebeau, C.N., Ajit, D., Camden, J.M., Woods, L.T., Wood, W.G., Petris, M.J., Sun, G.Y., Erb, L., & Weisman, G.A. 2013. Up-regulation and activation of the P2Y2 nucleotide receptor mediate neurite extension in IL-1-treated mouse primary cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 125, (6) 885-896
- (199) Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., DiMeco, F., & Vescovi, A.L. 2006. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, 444, (7120) 761-765
- (200) Pines, G., Kostler, W.J., & Yarden, Y. 2010. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett.*, 584, (12) 2699-2706
- (201) Pozo, N., Zahonero, C., Fernandez, P., Linares, J.M., Ayuso, A., Hagiwara, M., Perez, A., Ricoy, J.R., Hernandez-Lain, A., Sepulveda, J.M., & Sanchez-Gomez, P. 2013. Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J Clin Invest*, 123, (6) 2475-2487
- (202) Prigent, S.A., Nagane, M., Lin, H., Huvar, I., Boss, G.R., Feramisco, J.R., Cavenee, W.K., & Huang, H.S. 1996. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol.Chem.*, 271, (41) 25639-25645
- (203) Puliappadamba, V.T., Chakraborty, S., Chauncey, S.S., Li, L., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., Noorani, S., Shu, H.K., Burma, S., Boothman, D.A., & Habib, A.A. 2013. Opposing effect of EGFRWT on EGFRvIII-mediated NF-kappaB activation with RIP1 as a cell death switch. *Cell Rep.*, 4, (4) 764-775

- (204) Raizer, J.J., Abrey, L.E., Lassman, A.B., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Yung, W.K., Gilbert, M.R., Aldape, K.A., Wen, P.Y., Fine, H.A., Mehta, M., DeAngelis, L.M., Lieberman, F., Cloughesy, T.F., Robins, H.I., Dancey, J., & Prados, M.D. 2010. A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro.Oncol.*, 12, (1) 95-103
- (205) Ramnarain, D.B., Park, S., Lee, D.Y., Hatanpaa, K.J., Scoggin, S.O., Otu, H., Libermann, T.A., Raisanen, J.M., Ashfaq, R., Wong, E.T., Wu, J., Elliott, R., & Habib, A.A. 2006. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res*, 66, (2) 867-874
- (206) Ren, J., Bollu, L.R., Su, F., Gao, G., Xu, L., Huang, W.C., Hung, M.C., & Weihua, Z. 2013. EGFR-SGLT1 interaction does not respond to EGFR modulators, but inhibition of SGLT1 sensitizes prostate cancer cells to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Prostate*, 73, (13) 1453-1461
- (207) Rich, J.N., Reardon, D.A., Peery, T., Dowell, J.M., Quinn, J.A., Penne, K.L., Wikstrand, C.J., Van Duyn, L.B., Dancey, J.E., McLendon, R.E., Kao, J.C., Stenzel, T.T., Ahmed Rasheed, B.K., Tourt-Uhlig, S.E., Herndon, J.E., Vredenburgh, J.J., Sampson, J.H., Friedman, A.H., Bigner, D.D., & Friedman, H.S. 2004. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.*, 22, (1) 133-142
- (208) Riddick, G. & Fine, H.A. 2011. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas. *Nat.Rev Neurol.*, 7, (8) 439-450
- (209) Riemenschneider, M.J. & Reifenberger, G. 2009. Molecular neuropathology of gliomas. *Int.J.Mol.Sci.*, 10, (1) 184-212
- (210) Rubin, C., Litvak, V., Medvedovsky, H., Zwang, Y., Lev, S., & Yarden, Y. 2003. Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr.Biol.*, 13, (4) 297-307
- (211) Sakaguchi, M., Oka, M., Iwasaki, T., Fukami, Y., & Nishigori, C. 2012. Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol.*, 132, (7) 1877-1885
- (212) Scales, T.M., Lin, S., Kraus, M., Goold, R.G., & Gordon-Weeks, P.R. 2009. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J.Cell Sci.*, 122, (Pt 14) 2424-2435
- (213) Schlegel, U., Moots, P.L., Rosenblum, M.K., Thaler, H.T., & Furneaux, H.M. 1990. Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene*, 5, (12) 1839-1842

- (214) Scott, A.M., Lee, F.T., Tebbutt, N., Herbertson, R., Gill, S.S., Liu, Z., Skrinos, E., Murone, C., Saunderson, T.H., Chappell, B., Papenfuss, A.T., Poon, A.M., Hopkins, W., Smyth, F.E., MacGregor, D., Cher, L.M., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Brechbiel, M.W., Murphy, R., Burgess, A.W., Hoffman, E.W., Johns, T.G., & Old, L.J. 2007. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 104, (10) 4071-4076
- (215) See, A.P., Han, J.E., Phallen, J., Binder, Z., Gallia, G., Pan, F., Jinasena, D., Jackson, C., Belcaid, Z., Jeong, S.J., Gottschalk, C., Zeng, J., Ruzevick, J., Nicholas, S., Kim, Y., Albesiano, E., Pardoll, D.M., & Lim, M. 2012. The role of STAT3 activation in modulating the immune microenvironment of GBM. *J Neurooncol.*, 110, (3) 359-368
- (216) Seifert, A., Allan, L.A., & Clarke, P.R. 2008. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J*, 275, (24) 6268-6280
- (217) Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A., & Crabtree, G.R. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241, (4862) 202-205
- (218) Shindoh, N., Kudoh, J., Maeda, H., Yamaki, A., Minoshima, S., Shimizu, Y., & Shimizu, N. 1996. Cloning of a human homolog of the Drosophila minibrain/rat Dyrk gene from "the Down syndrome critical region" of chromosome 21. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 225, (1) 92-99
- (219) Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., & Ushio, Y. 2003. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 63, (20) 6962-6970
- (220) Simmons, M.L., Lamborn, K.R., Takahashi, M., Chen, P., Israel, M.A., Berger, M.S., Godfrey, T., Nigro, J., Prados, M., Chang, S., Barker, F.G., & Aldape, K. 2001. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res*, 61, (3) 1122-1128
- (221) Siveen, K.S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A.P., Tan, B.K., Sethi, G., & Bishayee, A. 2014. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim.Biophys.Acta*, 1845, (2) 136-154

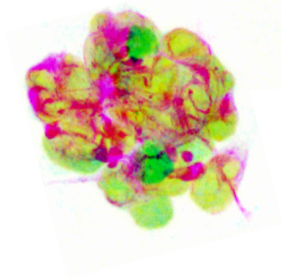
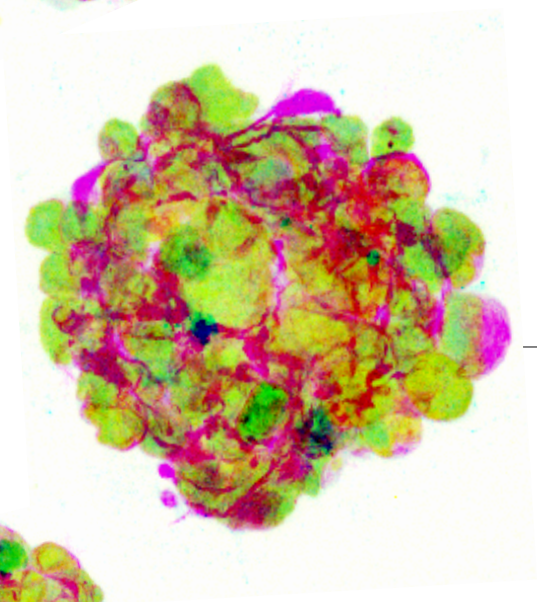
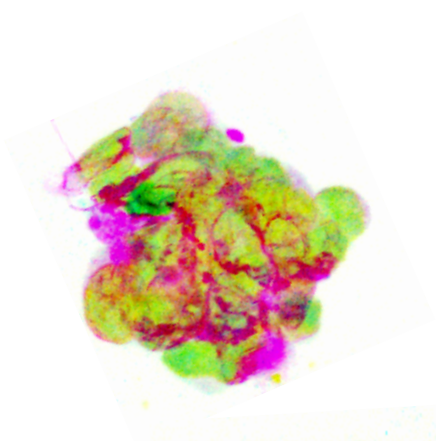
- (222) Smith, B., Medda, F., Gokhale, V., Dunckley, T., & Hulme, C. 2012. Recent advances in the design, synthesis, and biological evaluation of selective DYRK1A inhibitors: a new avenue for a disease modifying treatment of Alzheimer's? *ACS Chem.Neurosci.*, 3, (11) 857-872
- (223) Smith, J.S., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K., Borell, T.J., Iturria, N., O'Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., James, C.D., Buckner, J.C., & Jenkins, R.B. 2001. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*, 93, (16) 1246-1256
- (224) Soeda, A., Inagaki, A., Oka, N., Ikegame, Y., Aoki, H., Yoshimura, S., Nakashima, S., Kunisada, T., & Iwama, T. 2008. Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol.Chem.*, 283, (16) 10958-10966
- (225) Song, L., Morris, M., Bagui, T., Lee, F.Y., Jove, R., & Haura, E.B. 2006. Dasatinib (BMS-354825) selectively induces apoptosis in lung cancer cells dependent on epidermal growth factor receptor signaling for survival. *Cancer Res*, 66, (11) 5542-5548
- (226) Song, W.J., Sternberg, L.R., Kasten-Sportes, C., Keuren, M.L., Chung, S.H., Slack, A.C., Miller, D.E., Glover, T.W., Chiang, P.W., Lou, L., & Kurnit, D.M. 1996. Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". *Genomics*, 38, (3) 331-339
- (227) Song, Y., Kesuma, D., Wang, J., Deng, Y., Duan, J., Wang, J.H., & Qi, R.Z. 2004. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 317, (1) 128-132
- (228) Sos, M.L., Koker, M., Weir, B.A., Heynck, S., Rabinovsky, R., Zander, T., Seeger, J.M., Weiss, J., Fischer, F., Frommolt, P., Michel, K., Peifer, M., Mermel, C., Girard, L., Peyton, M., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Garraway, L.A., Kashkar, H., Pao, W., Meyerson, M., & Thomas, R.K. 2009. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res.*, 69, (8) 3256-3261
- (229) Stea, B., Falsey, R., Kislin, K., Patel, J., Glanzberg, H., Carey, S., Ambrad, A.A., Meuillet, E.J., & Martinez, J.D. 2003. Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). *Cancer Lett.*, 202, (1) 43-51
- (230) Steinbach, J.P., Klumpp, A., Wolburg, H., & Weller, M. 2004. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Cancer Res*, 64, (5) 1575-1578

- (231) Stockhausen, M.T., Kristoffersen, K., Stobbe, L., & Poulsen, H.S. 2014. Differentiation of glioblastoma multiforme stem-like cells leads to downregulation of EGFR and EGFRvIII and decreased tumorigenic and stem-like cell potential. *Cancer Biology & Therapy*, 15, (2) 216-224
- (232) Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R.O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, (10) 987-996
- (233) Stutz, M.A., Shattuck, D.L., Laederich, M.B., Carraway, K.L., III, & Sweeney, C. 2008. LRIG1 negatively regulates the oncogenic EGF receptor mutant EGFRvIII. *Oncogene*, 27, (43) 5741-5752
- (234) Su, X., Gopalakrishnan, V., Stearns, D., Aldape, K., Lang, F.F., Fuller, G., Snyder, E., Eberhart, C.G., & Majumder, S. 2006. Abnormal expression of REST/NRSF and Myc in neural stem/progenitor cells causes cerebellar tumors by blocking neuronal differentiation. *Mol. Cell Biol.*, 26, (5) 1666-1678
- (235) Sun, M., Hillmann, P., Hofmann, B.T., Hart, J.R., & Vogt, P.K. 2010. Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85alpha of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110alpha. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.*, 107, (35) 15547-15552
- (236) Szerlip, N.J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E.C., Huse, J.T., Jhanwar, S., Leversha, M.A., Mikkelsen, T., & Brennan, C.W. 2012. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.*, 109, (8) 3041-3046
- (237) Taub, J.W., Mundschau, G., Ge, Y., Poulik, J.M., Qureshi, F., Jensen, T., James, S.J., Matherly, L.H., Wechsler, J., & Crispino, J.D. 2004. Prenatal origin of GATA1 mutations may be an initiating step in the development of megakaryocytic leukemia in Down syndrome. *Blood*, 104, (5) 1588-1589
- (238) van den Bent, M.J., Brandes, A.A., Rampling, R., Kouwenhoven, M.C., Kros, J.M., Carpentier, A.F., Clement, P.M., Frenay, M., Campone, M., Baurain, J.F., Armand, J.P., Taphoorn, M.J., Tosoni, A., Kletzl, H., Klughammer, B., Lacombe, D., & Gorlia, T. 2009. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol.*, 27, (8) 1268-1274

- (239) Verreault, M., Weppeler, S.A., Stegeman, A., Warburton, C., Strutt, D., Masin, D., & Bally, M.B. 2013. Combined RNAi-mediated suppression of Rictor and EGFR resulted in complete tumor regression in an orthotopic glioblastoma tumor model. *PLoS.One.*, 8, (3) e59597
- (240) Vivanco, I., Rohle, D., Versele, M., Iwanami, A., Kuga, D., Oldrini, B., Tanaka, K., Dang, J., Kubek, S., Palaskas, N., Hsueh, T., Evans, M., Mulholland, D., Wolle, D., Rajasekaran, S., Rajasekaran, A., Liao, L.M., Cloughesy, T.F., Dikic, I., Brennan, C., Wu, H., Mischel, P.S., Perera, T., & Mellinghoff, I.K. 2010. The phosphatase and tensin homolog regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor response by targeting EGFR for degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107, (14) 6459-6464
- (241) Wang, S.C., Nakajima, Y., Yu, Y.L., Xia, W., Chen, C.T., Yang, C.C., McIntush, E.W., Li, L.Y., Hawke, D.H., Kobayashi, R., & Hung, M.C. 2006. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat.Cell Biol.*, 8, (12) 1359-1368
- (242) Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., & Ohgaki, H. 2009. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am.J.Pathol.*, 174, (4) 1149-1153
- (243) Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., & Crispino, J.D. 2002. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat.Genet.*, 32, (1) 148-152
- (244) Wegiel, J., Dowjat, K., Kaczmarek, W., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur, K.B., Wegiel, J., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Gong, C.X., Liu, F., Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., & Hwang, Y.W. 2008. The role of overexpressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Acta Neuropathol.*, 116, (4) 391-407
- (245) Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., Chen-Hwang, M.C., & Hwang, Y.W. 2004. Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res*, 1010, (1-2) 69-80
- (246) Weihua, Z., Tsan, R., Huang, W.C., Wu, Q., Chiu, C.H., Fidler, I.J., & Hung, M.C. 2008. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell*, 13, (5) 385-393
- (247) Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R., & Wick, W. 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro.Oncol.*, 15, (1) 4-27

- (248) Wen, Z., Zhong, Z., & Darnell, J.E., Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82, (2) 241-250
- (249) Wheeler, D.L., Dunn, E.F., & Harari, P.M. 2010. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat.Rev Clin Oncol.*, 7, (9) 493-507
- (250) Wong, E.S., Fong, C.W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B.C., Langdon, W.Y., & Guy, G.R. 2002. Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J.*, 21, (18) 4796-4808
- (251) Wong, E.T., Hess, K.R., Gleason, M.J., Jaeckle, K.A., Kyritsis, A.P., Prados, M.D., Levin, V.A., & Yung, W.K. 1999. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J.Clin.Oncol.*, 17, (8) 2572-2578
- (252) Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batnig-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., & Bigner, D.D. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360, (8) 765-773
- (253) Yang, Y.R., Follo, M.Y., Cocco, L., & Suh, P.G. 2013. The physiological roles of primary phospholipase C. *Adv.Biol.Regul.*, 53, (3) 232-241
- (254) Yarden, Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4, S3-S8
- (255) Ye, F., Gao, Q., Xu, T., Zeng, L., Ou, Y., Mao, F., Wang, H., He, Y., Wang, B., Yang, Z., Guo, D., & Lei, T. 2009. Upregulation of LRIG1 suppresses malignant glioma cell growth by attenuating EGFR activity. *J Neurooncol.*, 94, (2) 183-194
- (256) Ying, H., Zheng, H., Scott, K., Wiedemeyer, R., Yan, H., Lim, C., Huang, J., Dhakal, S., Ivanova, E., Xiao, Y., Zhang, H., Hu, J., Stommel, J.M., Lee, M.A., Chen, A.J., Paik, J.H., Segatto, O., Brennan, C., Elferink, L.A., Wang, Y.A., Chin, L., & DePinho, R.A. 2010. Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 107, (15) 6912-6917
- (257) Yoshimoto, K., Dang, J., Zhu, S., Nathanson, D., Huang, T., Dumont, R., Seligson, D.B., Yong, W.H., Xiong, Z., Rao, N., Winther, H., Chakravarti, A., Bigner, D.D., Mellinghoff, I.K., Horvath, S., Cavenee, W.K., Cloughesy, T.F., & Mischel, P.S. 2008. Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples. *Clin.Cancer Res.*, 14, (2) 488-493
- (258) Yue, X., Song, W., Zhang, W., Chen, L., Xi, Z., Xin, Z., & Jiang, X. 2008. Mitochondrially localized EGFR is subjected to autophagic regulation and implicated in cell survival. *Autophagy.*, 4, (5) 641-649

- (259) Yung, W.K., Zhang, X., Steck, P.A., & Hung, M.C. 1990. Differential amplification of the TGF- α gene in human gliomas. *Cancer Commun.*, 2, (6) 201-205
- (260) Zawrocki, A. & Biernat, W. 2005. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Folia Neuropathol.*, 43, (3) 123-132
- (261) Zhang, Q., Thomas, S.M., Xi, S., Smithgall, T.E., Siegfried, J.M., Kamens, J., Gooding, W.E., & Grandis, J.R. 2004. SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer Res*, 64, (17) 6166-6173
- (262) Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., & Kuriyan, J. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125, (6) 1137-1149
- (263) Zhang, X., Zhang, H., Tighiouart, M., Lee, J.E., Shin, H.J., Khuri, F.R., Yang, C.S., Chen, Z., & Shin, D.M. 2008. Synergistic inhibition of head and neck tumor growth by green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate and EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Int J Cancer*, 123, (5) 1005-1014
- (264) Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., Bronson, R.T., Chen, J.W., Weissleder, R., Housman, D.E., & Charest, A. 2009. Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*, 106, (8) 2712-2716
- (265) Zhu, H., Cao, X., Ali-Osman, F., Keir, S., & Lo, H.W. 2010. EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett.*, 294, (1) 101-110
- (266) Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., & McKeon, F. 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*, 93, (5) 851-861
- (267) Zhu, Y.N. & Shah, K. 2014. Multiple lesions in receptor tyrosine kinase pathway determine glioblastoma response to pan-ERBB inhibitor PF-00299804 and PI3K/mTOR dual inhibitor PF-05212384. *Cancer Biology & Therapy*, 15, (6) 815-822



ANEXOS

1. Publicaciones que forman parte de la tesis

AUTORES/AS (p.o. de firma): Pozo N*, Zahonero C*, Fernández P, Liñares JM, Ayuso A, Hagiwara M, Pérez A, Ricoy JR, Hernández-Lain A, Sepúlveda JM, Sánchez-Gómez P.

* co-autores

TÍTULO: Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth.

REVISTA: Journal of the Clinical Investigation

FECHA DE PUBLICACIÓN: Mayo de 2013

REFERENCIA: J Clin Invest. 2013;123(6):2475–2487. doi:10.1172/JCI63623

AUTORES/AS (p.o. de firma): Cristina Zahonero*, Pilar Sánchez-Gómez*

* co-autores

TÍTULO: EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy

REVISTA: Cellular and Molecular Life Sciences

FECHA DE PUBLICACIÓN: Marzo de 2014

REFERENCIA: Cell. Mol. Life Sci. (2014) 71:3465-3488. doi:10.1007/s00018-014-1608-1

2. Otras publicaciones

AUTORES/AS (p.o. de firma): Paloma Fernández, Cristina Zahonero, Pilar Sánchez-Gómez

TÍTULO: DYRK1A: the double-edged kinase claims its protagonism in cell growth and tumorigenesis

REVISTA: Molecular & Cellular Oncology

FECHA DE PUBLICACIÓN: Aceptado en Septiembre de 2014

